

RADIOIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG
DES FREIEN URINCORTISOLS
BEI KINDERN UND JUGENDLICHEN

Annelies Schmölz

1985

*Diss
München*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547927_0109

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr. von Haunerschen Kinderspital

Vorstand: Prof. Dr. med. H.-B. Hadorn

Radioimmunologische Bestimmung des freien Urincortisols
bei Kindern und Jugendlichen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Annelies Schmölz
aus Kaufbeuren
1985

Mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Bidlingmaier
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H.-B. Hadorn
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	13.2.1986

Dem ehemaligen Direktor der Kinderklinik der Universität München Herrn Prof. Dr. K. Betke und dem jetzigen Direktor Herrn Prof. Dr. H.-B. Hadorn danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeit an Ihrer Klinik durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. F. Bidlingmaier für die Überlassung des Themas. Seine Anregungen und bereitwilligen Erklärungen auf meine Fragen trugen viel zum Gelingen der Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. D. Knorr danke ich vielfach für seine prompte und selbstverständliche Hilfestellung bei klinischen Problemen.

Herrn Dr. H. Dörr danke ich für die Hilfe bei der Statistik und die Erlaubnis, den Rechner zu benutzen.

Bei den Assistentinnen des endokrinologischen Labors, besonders bei Frau Wohlfahrt und bei Frau Wolf, möchte ich mich für die freundliche Aufnahme und die Einweisung in die methodischen Grundlagen des RIAs bedanken.

1. Einleitung

1.1. Cortisol allgemein

1.2.1. Biosynthese und Steuerung der Glukocorticosteroide

1.2.2. Abbau und Ausscheidung

1.3. Bestimmungsmethoden

1.3.1. photometrisch

1.3.2. fluorimetrisch

1.3.3. Gaschromatographie

1.3.4. RIA

1.4.1. Definition, Pathogenese und Klinik des Hypercortisolismus

1.4.2. Diagnose und Differentialdiagnose des Hypercortisolismus

1.4.3. Problematik der definitiven Diagnose eines Cushing-Syndroms

1.4.3.1. Diagnostische Schwierigkeiten bei Adipositas

1.4.3.2. Hospitalisierung und Stress

1.4.3.3. Einfluß extraadrenaler Erkrankungen und Medikationen

1.5.1. Praktischer Stellenwert und Vorteile der Bestimmung des freien Urincortisols in der Cushing-Diagnostik

1.5.2. Einfluß der Nierenfunktion auf die Ausscheidung des freien Urincortisols

2. Experimenteller Teil

2.1. Fragestellung

2.2. Versuchsbeschreibung

2.2.1. Probanden und Patienten

2.2.2. Das Sammeln eines 24-Stundenurins

2.3. Methodik

2.3.1. Verwendete Reagenzien

2.3.2. Lösungen

2.3.3. Geräte

2.3.4. Versuchsbedingungen

2.3.5. Antiserum

2.3.6. Eichkurve

- 2.3.6.1. Empfindlichkeit der Eichkurve
- 2.3.6.2. Erstellung der Eichkurve
- 2.3.7. Versuch
 - 2.3.7.1. Versuchsprinzip
 - 2.3.7.2. Versuchsablauf
 - 2.3.7.3. Extraktion
 - 2.3.7.4. Wiederfindung
- 2.3.8. Vorversuche
 - 2.3.8.1. Zeit- und Temperaturfaktoren
 - 2.3.8.2. Einfluß der Inkubationszeit
 - 2.3.8.3. Einfluß der Verdünnung und des eingesetzten Volumens
- 2.4. Qualitätskontrollen
 - 2.4.1. Ausgangsbindung und 50 % Interceptpunkt
 - 2.4.2. Untere Nachweisgrenze
 - 2.4.3. Intraassayvariabilität
 - 2.4.4. Interassayvariation
 - 2.4.5. Kontrolle des Testsystems auf Verunreinigung
 - 2.4.6. Kontrolle der Eichkurve im höheren Bereich
- 3. Ergebnisse
 - 3.1. Vergleich des RIA mit Extraktion mit dem RIA ohne Extraktion
 - 3.2. Altersabhängigkeit des freien Urincortisol
 - 3.3. Freies Urincortisol bezogen auf das Körpergewicht
 - 3.4. Freies Urincortisol bezogen auf die Körperoberfläche
 - 3.5. Freies Urincortisol bezogen auf die tägliche Kreatininausscheidung
 - 3.6. Bestimmung des freien Urincortisols im Morgenurin und in einzelnen Urinportionen
- 4. Diskussion
 - 4.1. Normalwerte in der Literatur
 - 4.2. Methodische Probleme und Interferenzen bei der Messung von freiem Urincortisol
 - 4.3. Alters- und Geschlechtsunterschiede
 - 4.4. Bezugssysteme

4.5. Adipöse Patienten

4.6. Hospitalisierung und Stress

4.7. Cushing-Syndrom

4.8. Wertigkeit des Morgenurins und einzelner Urinproben

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

1. Einleitung

1.1.

1563 beschreibt Eustachius Sanctose Verinatus die NNR und erkennt sie als besonderes Organ.

1855 beschreibt Th. Addison den NNR-Ausfall.

1856 stellt Brown-Sequard im Tierversuch die Lebenswichtigkeit der NNR fest.

1926 zeigt Smith, daß Hypophysektomie zur Atrophie der NNR führt.

1932 beschreibt Cushing das Syndrom der Überfunktion des Hypophysen-NNR-Systems.

1937 - 1952 gelangen die Isolierung und Synthese folgender NNR-Hormone: Corticosteron und Desoxycorticosteron, Cortison und Cortisol durch Reichstein, Kendall, Wintersteiner et al..

Die, in der NNR produzierten Steroidhormone werden in Glucocorticoide, Mineralocorticoide, Androgene und Östrogene eingeteilt.

Die Glucocorticoide, mit ihrem Hauptvertreter Cortisol haben eine wichtige Bedeutung im Intermediärstoffwechsel. Ihre Hauptwirkungen sind dabei vorwiegend anti-insulinär und beinhalten die Regulation des Protein-, Kohlenhydrat-, Fett- und Nucleinsäurenmetabolismus. Die Glucocorticoide fördern die Glykogenbildung und Gluconeogenese in der Leber und hemmen die periphere Glukoseverwertung. Auf den Proteinstoffwechsel wirken die Glucocorticoide katabol. Auf diese Weise werden vermehrt Aminosäuren zur Gluconeogenese bereitgestellt. Die Stickstoffbilanz wird negativ (Weiss et al. 1975).

Unter pharmakologischen Dosierungen der Glucocorticoide tritt Immunsuppression mit verminderter Antikörperbildung auf.

Die Glucocorticoide bewirken eine Umstellung des

Stoffwechsels vom Anabolismus zum Katabolismus. Anabol wirken die Glucocorticoide nur auf die Leber, die somit vermehrt Substrat zur Synthese von Glucose und Glykogen, also für Belastung nötige Substanzen erhält.

Selye (1953) beschreibt ihre Wirkung im Rahmen des allgemeinen Adaptionsyndroms als Umstellung des Körpers vom Aufbau zu rasch verfügbarer Leistung bei Belastung. Die Glucocorticoide üben auf andere Hormone, zu nennen wären Glucagon und Adrenalin, einen permissiven Effekt aus. Erst bei Anwesenheit von Glucocorticoiden kommt es bei Adrenalin zu gesteigerter Lipolyse und bei Glucagon und Adrenalin zu verstärkter Gluconeogenese (Weiss et al. 1975).

An der Niere bewirken die Glucocorticoide eine Erhöhung der Natrium- und Chloridionenreabsorption im proximalen und distalen Nierentubulus und gleichzeitig eine verstärkte Ausscheidung von Kalium-, Wasserstoff- und Ammoniumionen. Der Einfluß von Cortisol, dem wichtigsten physiologischen Glucocorticoid, auf den Mineralstoffwechsel ist um das Tausendfache geringer als der des Aldosterons, des wichtigsten Vertreters der Mineralocorticoide.

1.2.1. Biosynthese und Steuerung der Glucocorticoide

Cortisol und Cortison (Abb. 1) (Konzentration 10:1 im Blut des Erwachsenen) sind die wichtigsten der vom Menschen gebildeten Glucocorticoide. Sie werden hauptsächlich in der Zona fasciculata der NNR gebildet.

Sie leiten sich strukturell vom Steran (Abb. 1) ab, einem vollständig hydrierten Cyclopentanophenanthren. Für die Gluco- und Mineralocorticoidwirkung ist eine Hydroxylierung an C₂₁ notwendig. Die Glucocorticoidwirkung ist an eine Hydroxyl- bzw. Ketogruppe an C₁₁ gebunden. Eine Hydroxylgruppe an C₁₇ verstärkt die Glucocorticoidwirkung und schwächt die Mineralo-

corticoidwirkung ab.

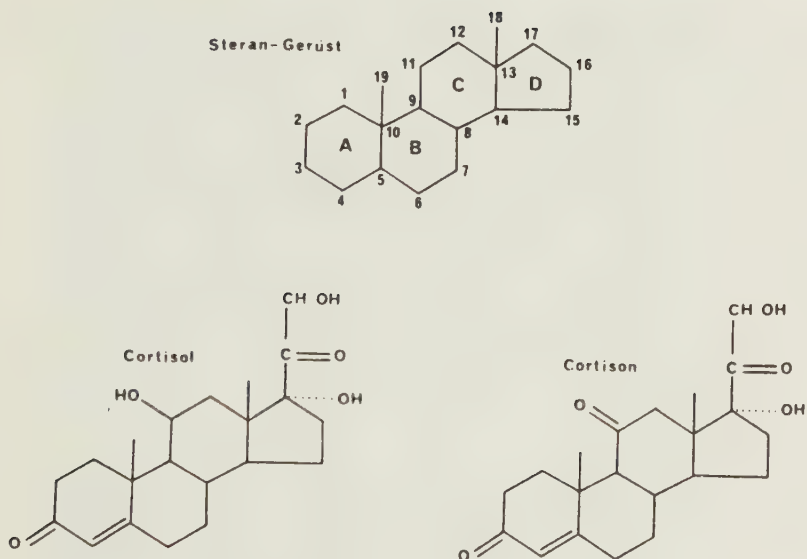


Abb. 1:

Steranskelett mit Nummerierung der Kohlenstoffatome und die Strukturformeln von Cortisol und Cortison.

Der Aufbauweg der Glucocorticoide beginnt bei Acetyl-Coenzym A über Cholesterin, Pregnenolon und 17 α -Hydroxyprogesteron bis zum Cortisol und Cortison, die unter dem Einfluß der 11 β -Dehydrogenase der Leber reversibel ineinander übergehen können. Die Cortisolkonzentration im Plasma wird von der hypothalamisch-hypophysären Achse gesteuert. Der hypothalamische Corticotropin-Releasing-Factor stimuliert die Adenohypophyse zur Abgabe von adrenocorticotropem Hormon (ACTH). Das ACTH gelangt über das

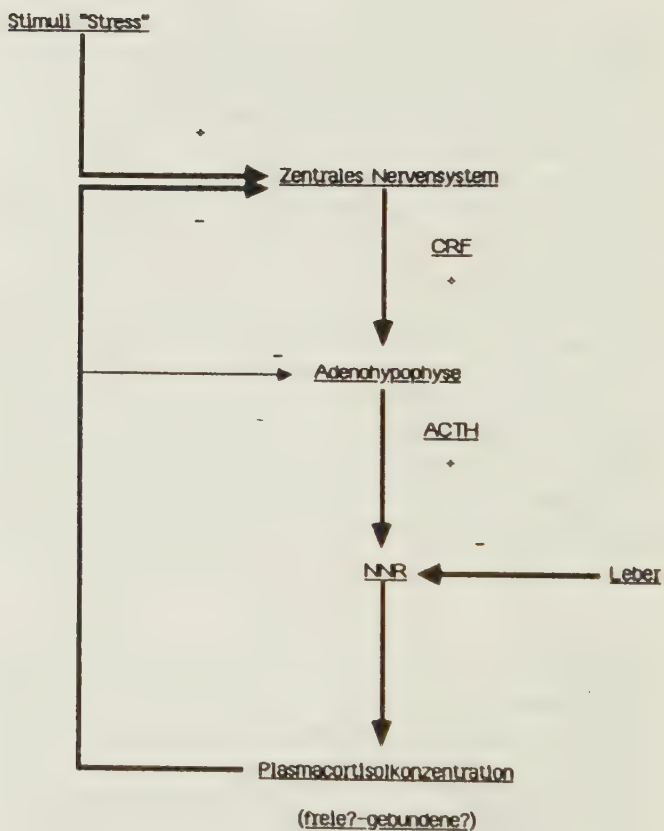


Abb. 2:

Regelkreis der Cortisolsynthese und Ausschüttung. Der dünn-gedruckte Pfeil gibt einen wahrscheinlichen, nicht entgültig gesicherten Rückkopplungsweg an. (Vereinfacht nach Labhart und Müller, 1980).

Blut zur NNR und stimuliert die Cortisolproduktion in der Zelle. Die Cortisolproduktion ist direkt von der ACTH-Plasmakonzentration abhängig. Die Plasmakonzentration und die Urinausscheidung an Cortisol steigen linear mit dem Logarithmus der ACTH-Plasmakonzentration an (Labhart und Müller 1980). Die höchste Cortisolkonzentration im Blut folgt dem ACTH-Peak mit einstündiger Verspätung (Petraglia et al. 1983). Die Stimulierung der Steroidsynthese und Steroidsekretion der NNR-Zelle unter dem Einfluß von ACTH wird über das Adenylat-Cyclase-System vermittelt. Das in die Zirkulation abgegebene Cortisol steuert seinerseits im Sinne eines negativen Feedbacks die Ausschüttung von CRF (Cortisol-releasing-factor) und ACTH, d. h. eine Verminderung des Cortisols führt zum Anstieg des ACTH und damit zu vermehrter Stimulation der NNR. Hohe Cortisolkonzentrationen supprimieren die ACTH-Ausschüttung und bewirken so eine verringerte NNR-Aktivität. In Abbildung 2 ist der Regelkreis der Cortisolsynthese und -ausschüttung dargestellt. Der dünngedruckte Pfeil gibt einen wahrscheinlichen, noch nicht endgültig gesicherten Rückkopplungsweg an. Die tägliche Cortisolproduktion beträgt 15-40 mg. Die Sekretion erfolgt episodisch und unterliegt einem circadianen Rhythmus mit 7-13 Peaks pro Tag (Hellmann et al. 1970; Krieger et al. 1971). Die höchsten Plasmawerte werden am Morgen zwischen 6 und 9 Uhr gefunden. Im Lauf des Tages sinkt der Plasmaspiegel bis Mitternacht ab, um dann ab morgens 2 Uhr wieder anzusteigen. Der Rhythmus ist unabhängig vom Tageslicht und der Jahreszeit (Bellastella et al. 1983), jedoch abhängig vom Schlafrhythmus. Die Halbwertszeit des sezernierten Cortisols beträgt 70-110 Minuten. Die Halbwertszeit des Cortisols ist bei Leberkrankheiten, Myxödem, bei Schock, bei Östrogenbehandlung, in der Schwangerschaft und bei Urämie verlängert, verkürzt ist sie bei Hyperthyreose und manchmal bei Adipositas (Müller 1980).

Im Blut sind 90 % des Cortisols an das α_1 -Globulin Transcortin gebunden. Transcortin besitzt eine hohe Affinität, jedoch eine beschränkte Bindungskapazität. Bei steigender Konzentration wird Cortisol außerdem an Albumin gebunden, das bei nahezu unbegrenzter Kapazität eine weit niedrigere Affinität besitzt. Die niedrigere Affinität des Albumins führt dazu, daß das biologisch aktive freie Cortisol, das bei Konzentrationen bis 20 $\mu\text{g/dl}$ 10 % beträgt, bei höheren Plasmakonzentrationen auf 20-30 % ansteigt. Auf diese Weise wird der glomerulär frei filtrierbare Anteil stark erhöht, und das freie Urincortisol, das normalerweise < 1 % des sezernierten Cortisols beträgt, steigt unverhältnismäßig an (Schwellenphänomen) (Burke und Beardwell 1972).

1.2.2. Abbau und Ausscheidung des Cortisols

Bei der Inaktivierung und dem Abbau des Cortisols spielt die Leber die wichtigste Rolle. Die Doppelbindung im Ring A zwischen C_4 und C_5 und die 3-Ketogruppe werden hydriert. 40-50 % des Cortisols werden bis zu dieser Stufe, den nicht mehr aktiven Tetrahydroverbindungen abgebaut. 20-30 % werden weiter zu Cortol und Cortolon metabolisiert, die durch Reduktion der Ketogruppe an C_{20} entstehen. Bei weniger als 10 % entstehen durch Abspaltung der Seitenkette 17-Ketosteroidoide. Die inaktivierten Metaboliten, Tetrahydrocortisol, allo-Tetrahydrocortisol und Tetrahydrocortison, Cortol und Cortolon werden an Glucuronsäure und in geringerem Maße an Schwefel- und Phosphorsäure gekoppelt. Diese konjugierten Steroidmetaboliten sind wasserlöslich und werden über die Niere ausgeschieden. 50-70 % des Cortisols erscheinen als Glucuronide im Urin. Daneben gibt es eine Anzahl von Cortisolabbauprodukten, die chemisch noch nicht definiert sind. 20 % der freien und auch der konjugierten Glucocorticoide werden über die Galle in den Darm sezerniert und partiell über den

enterohepatischen Kreislauf reabsorbiert. Die freie Plasmafraktion des Cortisols wird von der Niere frei filtriert und wieder zum größten Teil tubulär rückresorbiert. Nur maximal 1 % der Tagesproduktion gelangt unverändert in den Harn (Müller 1980).

Beim Vergleich der Urinmetaboliten von Cortisol zwischen Erwachsenen und Kindern findet man quantitative Unterschiede einzelner Abbauprodukte (Quenon et al. 1980). Der prozentuale Anteil von allo-Tetrahydrocortisol nimmt im Laufe des Wachstums zu, der höchste Prozentsatz findet sich in der Pubertät und fällt bei Erwachsenen wieder leicht ab (Teller 1967). Diese Veränderungen können, im Zusammenhang mit der Stimulation von Leberenzymen während der Pubertät, beim Anstieg der Geschlechtshormone gesehen werden.

1.3. Methoden zur Bestimmung von Cortisol und Cortisolmetaboliten im Blut und im Urin

1.3.1. Photometrische Bestimmungen von Steroidmetaboliten

In der 17-Hydroxysteroidanalyse für Urin nach Porter-Silber (1950) werden Steroide vom Typ des Cortisols mit einer Dihydroxyacetonseitenkette gemessen. Demnach erfaßt die Bestimmung Cortisol, Cortison, Tetrahydrocortisol, Tetrahydrocortison und 11-Desoxycortisol. Diese Bestimmung beruht auf einer Farbreaktion dieser Steroide mit Phenylhydrazin-Schwefelsäure. Die Methode ist durch eine ganze Reihe von Stoffwechselprodukten und Medikamenten störbar und besitzt eine relativ große Streubreite.

Da im Urin die Metaboliten der NNR-Hormone vorwiegend als Glucuronide bzw. als Sulfate vorliegen, müssen die Konjugate vor der Bestimmung mit dem Phenylhydrazinreagens nach Porter-Silber mit β -Glucuronidase

hydrolysiert werden und, um störende Einflüsse unspezifischer Art und Interferenzen mit anderen Steroidmetaboliten zu vermeiden, mit Methylenchlorid (Peterson et al. 1955) extrahiert werden. Mit dieser Methode erfaßt man 30 - 40 % des in 24 Stunden sezernierten Cortisols und mehrere seiner Metaboliten. Bei der Bestimmung der 17-ketogenen Steroide nach Norymberski et al. (1953) und der "totalen 17-OH-Corticoide" nach Appleby et al. (1955) werden die 17-Hydroxylgruppen der C₂₁-Steroide zu 17-Ketosteroiden oxydiert und mit der Zimmermannschen Reaktion (1935) gemessen. Auf diese Weise umgeht man die schwierige enzymatische Hydrolyse, da die 17-Ketosteroide relativ stabile Verbindungen sind und durch heiße Säurehydrolyse dekonjugiert werden können. Die 17-ketogenen Steroide umfassen mehr Cortisolmetaboliten als die Porter-Silber-Chromogene, allerdings werden auch nicht vom Cortisol abstammende Steroide z. B. Pregnantriol miterfaßt. In der Modifikation nach Appleby werden nach Elimination der 17-Ketosteroide durch Reduktion die 17-ketogenen Steroide in einem Arbeitsgang bestimmt.

1.3.2. Fluorometrische Bestimmung von Cortisol und Corticosteron im Blut

Diese wesentlich empfindlichere Methode beruht auf der Fluoreszenz von Cortisol und Corticosteron in konzentrierter Schwefelsäure. Das auf dieser Grundlage entwickelte Verfahren von Sweat (1954) beruht auf einer quantitativen fluorometrischen Messung nach einer säulenchromatographischen Trennung von Cortisol, Cortison und Corticosteron. Da Corticosteron eine dreifach stärkere Fluoreszenzreaktion als Cortisol ergibt und Cortisol : Corticosteron im Plasma = 10 : 1, führt die Methode zu 30 % höheren Werten als das Porter-Silber-Verfahren. Espiner (1965) wies nach, daß

Cortisol nur 8-73 % der im Urin gemessenen Fluoreszenz ausmacht. Was sonst noch mitgemessen wird, ist unklar und in verschiedenen Urinproben in unterschiedlichen Konzentrationen enthalten (Cope und Black 1959; Mattingly et al. 1964).

Trotz weiterer Modifikationen (Ratcliff und Hall 1973) führten diese Methoden nicht zu genügend hoher Spezifität. Die Normalwerte für die einzelnen Verfahren differierten stark und lagen gegenüber den spezifischen aber sehr aufwendigen Doppelisotopenverfahren und dem RIA erheblich höher.

1.3.3. Gaschromatographie

Bei der Gaschromatographie benutzt man zur Trennung der einzelnen Steroide die unterschiedliche Verteilung der Steroide im gasförmigen Zustand zwischen einer mobilen Gasphase und einem lipophilen Flüssigkeitsfilm, mit dem das Säulenfüllmaterial benetzt ist,

Eine mit der stationären Phase beschichtete Säule, die vom Trägergas durchströmt wird, wird auf 150 - 210 °C aufgeheizt. Das zu trennende Steroidgemisch sublimiert bei dieser hohen Temperatur sofort und wird durch das Trägergas durch die Säule gespült. Substanzen, die eine höhere Affinität zur stationären Phase haben, werden stärker retiniert und erscheinen später am Auslaß der Chromatographiesäule als Substanzen mit geringerer Affinität. Die austretenden Steroide in der Gasphase werden durch Ionisationsdetektoren registriert. Die Stärke des Signals ist hierbei abhängig von der Menge der jeweiligen Einzelkomponenten in dem Gemisch. Identifiziert werden die einzelnen Komponenten mit Hilfe von standardisierten Chromatogrammen. Der Vorteil der Gas-Flüssigkeit-Chromatographie liegt in der hohen Spezifität und der guten Empfindlichkeit der Methode (Phillipou 1982). Gaschromatographische Untersuchungen sind jedoch relativ aufwendig und werden nur in einigen

wenigen hochspezialisierten endokrinologischen Laboratorien durchgeführt.

1.3.4. Radioimmunassay

Einen großen Fortschritt für die Bestimmung des Cortisols im Plasma und Urin bedeutete die Entwicklung der Ligandenbindungsassays, d. h. die Entwicklung des Proteinbindungsassays und des RIAs. Prinzip beider Assays ist die Konkurrenz markierter und unmarkierter Liganden um Bindungsstellen an einem Protein bzw. an einem entsprechenden Antikörper (AK).

Die Vorteile dieser Testsysteme liegen in ihrer Praktikabilität und ihrer hohen Empfindlichkeit. Je nach Aufwand der Probenvorbereitung (Extraktion mit organischen Lösungsmitteln, chromatographische Vorreinigung) läßt sich eine gute bis hohe Spezifität erzielen.

1960 veröffentlichte Ekins (Sokolowski und Wood 1981) einen kompetitiven Proteinbindungsassay zur Bestimmung von Thyroxin. Fast gleichzeitig erschien die erste radioimmunologische Bestimmung eines Hormons, der Insulinassay von Yalow und Berson (1959) unter Benutzung eines Insulinantikörpers.

Die Entdeckung, daß Cortisol und andere Steroidhormone durch Kopplung an höhermolekulare Proteine zu Immunogenen werden, ermöglichte es, in Tieren eine Antikörperbildung gegen das Hapten, in diesem Fall gegen Cortisol zu induzieren. Die Stabilität, hohe Spezifität und Affinität des so gewonnenen Antikörpers ließ den Steroidradioimmunassay gegenüber dem weniger sensiblen und stärker störanfälligen kompetitiven Proteinbindungsassay in den Vordergrund treten (Brombacher et al. 1975).

Der Radioimmunassay beruht wie der kompetitive Proteinbindungsassay auf einer Sättigungsanalysetechnik.

Prinzip dieser Methode ist die kompetitive Konkurrenz einer definierten Menge radioaktiv markierten Hormons mit einer unbekannten Menge unmarkierten Hormons um Bindungsstellen an einer konstanten Menge eines spezifischen Antikörpers beim Radioimmunassay bzw. eines spezifischen Bindungsproteins beim kompetitiven Proteinbindungsassay.

Folgende Bedingungen müssen bei einem zuverlässigen Radioimmunassay erfüllt sein:

1. Der Antikörper muß eine hohe Affinität zu dem zu bestimmenden Hormon haben.
 2. Die definierte Menge an radioaktiv markiertem Hormon sollte sich hinsichtlich Affinität und Bindungskinetik genauso oder sehr ähnlich wie das nicht markierte Hormon verhalten.
 3. Das zu testende Hormon muß zur Anlegung einer Eichkurve in möglichst reiner Form vorhanden sein.
 4. Die Konzentration an Antikörper muß konstant und kleiner sein als die ebenfalls konstante Konzentration an markiertem Antigen.
 5. Die Konzentration an unmarkiertem Antigen in der Probe ist variabel, muß aber durch eventuelle Verdünnung der Proben im Meßbereich der Standard Eichkurve liegen.
- Während der Inkubation der Antikörper mit den markierten und unmarkierten Antigenen, die bis zur Gleichgewichtseinstellung dauern sollte, konkurrieren die markierten und unmarkierten Antigenmoleküle um die freien Bindungsstellen des Antikörpers und bilden gemäß ihren Konzentrationsverhältnissen lösliche Antigen-Antikörperkomplexe. Bei steigenden Mengen unmarkierten Antigens werden immer mehr markierte Antigenmoleküle aus den Antikörperbindungsstellen verdrängt, d. h. die Menge des gebundenen unmarkierten Hormons ist umgekehrt proportional zur Menge an gebundenem radioaktiv markierten Hormon. Nach der Gleichgewichtseinstellung wird die gebundene von der freien Fraktion getrennt. Die Radioaktivität kann entweder in der gebundenen oder in der freien Fraktion gemessen werden.

1.4.1 Definition, Pathogenese und Klinik des Hypercortisolismus

1932 beschrieb Harvey Cushing ein Syndrom, das mit Stammfettsucht, Hypertension, Ermüdbarkeit und Schwäche, Amenorrhoe, Hirsutismus, Striae rubrae distensae, Ödemen, Glucosurie und Osteoporose einhergeht.

Mittlerweile ist bekannt, daß unabhängig von der Ätiologie, alle Fälle von Cushing-Syndromen auf einer erhöhten Cortisolproduktion der NNR oder einer iatrogenen Glucocorticoidzufuhr beruhen. Nach Standardisierung und leichter Verfügbarkeit der klinischen Tests wird das Cushing-Syndrom inzwischen nach seiner Ätiologie klassifiziert (Harrison 1983):

A. NNR-Hyperplasie

- a. sekundär als Folge von hypophysärer ACTH Überproduktion
 - aa. Hypophysäre-Hypothalamische Dysfunktion
 - ab. Hypophysäre ACTH-produzierende Mikro- oder Makroadenome
- b. sekundär bei ACTH-produzierenden endokrinen Tumoren (Bronchialkarzinom, Thymom usw.)

B. Noduläre NNR-Hyperplasie

C. NNR-Tumoren

- a. Adenome
- b. Karzinome

D. Exogen, iatrogen

- a. langfristige Glucocorticosteroidtherapie
- b. längerdauernde ACTH-Therapie

2/3 der nicht iatrogenen Cushing-Syndrome bei Kindern

beruhen auf NNR-Karzinomen, das restliche 1/3 vorwiegend auf NNR-Adenomen und zentral bedingten Cushing-Syndromen.

An klinischen Symptomen findet man bei Kindern statt Stammfettsucht oft generalisierte Fettsucht (Hughes 1982), Plethora, Pausbacken, Stiernacken, dünne fragile Haut, blaurote Striae, Akne, Osteoporose und als einzig obligates und somit wichtigstes Symptom Hinderwuchs (Solomon und Schoen 1976). Cushing-Symptome sind oft nur sehr diskret vorhanden und meist nicht pathognomonisch. Verdächtig für ein NNR-Karzinom sind Virilisierungserscheinungen bei Mädchen, Pseudopubertas praecox und seltener Feminisierung bei Knaben.

Insgesamt ist das Cushing-Syndrom eine seltene Erkrankung im Kindesalter. Falls jedoch der leiseste Verdacht eines Cushing-Syndroms vorliegt, muß wegen der ernststen Prognose des im jugendlichen Alter am häufigsten vorkommenden NNR-Karzinoms ein Hypercortisolismus klar ausgeschlossen werden.

1.4.2. Diagnose und Differentialdiagnose des Hypercortisolismus

Bei der Diagnose des Cushing-Syndroms stellen sich dem Kliniker vor allem zwei Probleme.

A. Definitive Diagnose eines Cushing-Syndroms

B. Abklärung der Ursachen des Cushing-Syndroms

Um diese Fragen zu klären, muß man eine Reihe von Laboruntersuchungen berücksichtigen. Diese werden üblicherweise in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe dient zur Sicherung der Diagnose, die zweite zur Klärung der Ätiologie.

ad A.

a. Niedrig-dosierter Dexamethason-Hemmtest

bzw. Kurzzeit-Dexamethason-Hemmtest

b. Plasmacortisolmessungen als Tagesprofil

c. Bestimmung der Urinsteroidmetaboliten und des freien

Urincortisols

d. Messung der Cortisolproduktionsrate

e. Insulin-Toleranztest

ad B.

a. Hochdosierter Dexamethason-Hemmtest

b. Plasma-ACTH-Messungen

c. Metopirontest

d. ACTH-Stimmulierungstest

ad A.a.

Als sehr zuverlässig zur definitiven Diagnose eines Cushing-Syndroms gelten der Kurzzeit-Dexamethason-Hemmtest ($1 \times 1,5-2$ mg) und der niedrig dosierte Dexamethason-Hemmtest (0,5 mg alle 6 Stunden über 48 Stunden, Streeten et al. 1969). Wegen seiner geringeren Fehlerquote wird hauptsächlich der niedrig dosierte Dexamethason-Hemmtest angewendet. Durch niedrig dosierte Dexamethasongabe wird die Cortisolproduktionsrate bei Gesunden so supprimiert, daß am darauffolgenden Tag der Plasmacortisolspiegel auf Werte <2 µg/dl und die 17-OH-Steroide im Urin sowie das freie Urincortisol auf Werte $<1/2$ des Ausgangswertes sinken. Bei Adipösen ist das Plasma- und Urincortisol wie bei Gesunden suppressierbar. Als Diagnoseversagen ist der falsch negative Befund bei 50 % der Patienten mit hypophysären Mikroadenomen zu werten, ebenso wie der falsch positive Befund bei Patienten mit schweren Depressionen (Hughes 1982).

ad A.b.

Das Plasmacortisol kann auf verschiedene Weisen bestimmt werden. An den meisten Zentren wird mittlerweile der kompetitive Proteinbindungassay, der Radioimmunoassay oder ein Enzymimmunoassay verwendet. Mehrmalige tägliche Messungen des Plasmacortisols beruhen auf der Erkenntnis, daß bei Störungen der NNR die normale Cortisol-Tagesrhythmik aufgehoben ist. Krieger

et al. (1971) definieren den normalen Tagesrhythmus als ein Plasmamuster, bei dem alle Cortisolwerte von 16 Uhr bis 0 Uhr $< 75\%$ des 8 Uhr Wertes betragen. Da Cortisol in Peaks ausgeschüttet wird (Heilmann et al. 1970) und momentane Cortisolplasmawerte beim Cushing-Syndrom auch niedrig sein können (Espiner 1966), ergeben sich jedoch öfter falsch-positive und falsch-negative Befunde. Crapo (1979) kommt bei der Zusammenstellung von 18 Studien zu dem Ergebnis, daß das Cortisol-Tagesprofil und der Cortisol-Mitternachtsspiegel keine absolut zuverlässigen Ergebnisse liefern.

ad A.c.

Zur Messung der Urincorticoidausscheidung dienen mehrere Tests. Die Messung der 17-OH-Corticosteroide bzw. der Porter-Silber-Chromogene erfaßt 50 % der Cortisolmetaboliten im Urin. Die 17-ketogenen Steroide beinhalten die Cortisol-Metaboliten nach Umwandlung der 17-OH-Corticosteroide in 17-Ketosteroide, gemessen mit der Zimmermann-Reaktion. Beide Methoden beinhalten wegen ihrer Unspezifität eine erhebliche Fehlerquote. In den kombinierten Ergebnissen von verschiedenen Studien (Crapo 1979) führen sie zu falsch-negativen Resultaten bei 11 % und falsch-positiven Ergebnissen bei 27 % der untersuchten Patienten. Verantwortlich für die hohe Fehlerquote ist ein relativ breiter Überlappungsbereich zwischen Normalwerten und pathologischen Werten besonders bei adipösen Patienten.

Die Messung der täglichen freien Cortisolausscheidung im Urin dagegen führt bei Erwachsenen zu einer nahezu vollständigen Distinktion zwischen Gesunden und Kranken. Das freie Urincortisol wird nach organischer Lösungsmittelsextraktion per kompetitivem Proteinbindungsassay, RIA oder Papierchromatographie kombiniert mit einem colorimetrischen Assay gemessen.

Bei der Zusammenstellung von 15 Studien (Crapo 1979) ergeben sich 3,3 % falsch positive Werte und 5,6 % falsch negative Werte. Die Messungen per Proteinbindungsassay

und RIA sollen sogar eine völlige Unterscheidung zwischen Gesunden und Kranken bei Erwachsenen ermöglichen.

ad A.d.

Da das Cushing-Syndrom auf einer persistierenden endogenen erhöhten Cortisolsekretion beruht, kann die Messung der Cortisolproduktionsrate (CPR) hilfreich für die definitive Diagnose eines Cushing-Syndroms sein.

Radioaktiv-markiertes Cortisol (^{14}C -Cortisol) wird oral verabreicht. Per Gas- oder Papierchromatographie werden aus dem 24-Stundenurin THE (Tetrahydrocortison) oder THF (Tetrahydrocortisol) bestimmt (Schteingart et al. 1963). Durch Vergleich der spezifischen Aktivität des ^{14}C -Cortisols mit dem ^{14}C -THE bzw. ^{14}C -THF wird auf die Cortisolproduktionsrate geschlossen. Eingeschränkte Bedeutung hat die Messung der Cortisolproduktionsrate bei fettsüchtigen Patienten, die manchmal eine erhöhte CPR aufweisen und Patienten mit mild verlaufendem Cushing-Syndrom, bei denen die CPR nicht deutlich von den Normalwerten zu unterscheiden ist. Die Bestimmung der CPR ist invasiv und aufwendig und kann schon aus ethischen Gründen nicht für die Labordiagnostik des Cushing-Syndroms bei Kindern empfohlen werden.

ad A.e.

Patienten mit Cushing-Syndrom haben häufig eine verminderte Reaktion des Plasmacortisols auf insulininduzierte Hypoglykämie. Da der Insulintoleranztest aufwendig, belastend und mit 18 % falsch-negativer Werte eine hohe Fehlerquote hat (Crapo 1979), sollte er nur als Test bei schwer depressiv Kranken verwendet werden, die eine normale Antwort auf insulininduzierte Hypoglykämie zeigen, im Dexamethason-Hemmtest dagegen pathologisch reagieren.

Nachdem die Diagnose des Cushing-Syndroms, d. h. die vermehrte Cortisolproduktion, mit Hilfe der beschriebenen Tests gesichert ist, ist es nötig die Ätiologie zu klären. Dazu dienen die in 1.4.2. 8 genannten Tests, die hier kurz beschrieben werden sollen.

ad B.a. Hochdosierter Dexamethason-Suppressionstest
2 mg Dexamethason alle 6 Stunden über 48 Stunden supprimieren bis auf wenige Ausnahmen (Urbanic und George 1981) die Cortisolproduktion bei hypophysärem Hypercortisolismus auf Werte $< 50\%$ des Ausgangswertes. Patienten mit ektopter ACTH-Bildung, adrenalen Tumoren (Adenomen oder Carcinomen) zeigen keinen Abfall des Plasmacortisolspiegels und der Glucocorticoidausscheidung. In den wenigen unsicheren Fällen sollte der Dexamethasontest wiederholt werden bzw. über 3 Tage ausgedehnt werden (Liddle 1960).

ad B.b. Plasma-ACTH-Messungen

ACTH wird entweder per Bioassay oder RIA gemessen. Beide Methoden sind aufwendig, ergeben aber zuverlässige Ergebnisse (Hughes 1982). Bei NNR-Tumoren (Adenome und Karzinome) ist die ACTH-Sekretion der Hypophyse supprimiert, und das Plasma-ACTH ist nicht meßbar. Der Morbus Cushing, der auf einer erhöhten ACTH-Produktion der Adenohypophyse beruht, möglicherweise in einigen Fällen auch auf einer erhöhten hypothalamischen CRF-Ausschüttung, geht mit normalen bis leicht erhöhten ACTH-Spiegeln einher. Bei ektopter ACTH-Bildung z.B. beim kleinzelligen Bronchialkarzinom sind die ACTH-Werte stark erhöht. Der Überlappungsbereich zwischen zentralem Cushing-Syndrom und ektopter ACTH-Bildung ist klein. Die ACTH-Messung ist somit eine sehr wichtige Untersuchung zur Klärung der Ätiologie eines Cushing-Syndroms.

ad B.c. Metopiron-Test

Metopiron behindert die Cortisolsynthese der NNR in zwei Schritten: Zwischen Cholesterin und Pregnenolon und am Endschnitt der 11 β -Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol zu Cortisol. Wegen der gehemmten Cortisolsynthese kommt es nach Metopirongabe bei Gesunden und Patienten mit Morbus Cushing zu einer kompensatorischen Sekretionssteigerung von ACTH mit einem veränderten Glucocorticoidmetabolitenmuster im Plasma und Urin (Sayegh und Vestergaard 1978; Schöneshöfer et al. 1977). Das Plasma-11-Desoxycortisol und die 11-OH-Corticosteroide im Urin sind erhöht (Crapo 1979). Dagegen bewirkt Metopiron-Gabe bei Patienten mit Cushing-Syndrom bei NNR-Tumoren einen Abfall der 11-OH-Corticosteroidausscheidung im Urin (Carballeira et al. 1976). Ein NNR-Tumor gilt als bewiesen bei einem Abfall der 11-OH-Corticosteroide im Urin oder des 11-Desoxycortisols im Plasma. Normale oder leicht erhöhte Werte erlauben jedoch keine klare Differenzierung zwischen zentralem und peripherem Cushing Syndrom.

ad B.d. ACTH-Stimulationstest

Die Erhöhung des Plasmacortisol-Spiegels und der 17-OH-Corticosteroidausscheidung nach ACTH-Gabe hilft wegen großer Überschneidungen kaum die Ätiologie des Cushing-Syndroms zu klären (Brooks et al. 1963; Nichols et al. 1968).

1.4.3. Problematik der definitiven Diagnose eines Cushing-Syndroms

Die klinischen Symptome des Hypercortisolismus sind gerade im Kindesalter oft sehr diskret. Bei älteren Kindern findet man häufig nur Fettsucht und Minderwuchs (Hughes 1982). Als grobe Unterscheidung zur alimentären Fettsucht gilt die Regel, daß überernährte Kinder zu

groß für ihr Alter sind, Kinder mit Cushing-Syndrom dagegen zu klein sind. Eine Ausnahme bilden durch androgenbildende Tumoren verursachte Cushing-Syndrome, die zu verstärktem Längenwachstum und vorzeitiger Skelettreifung führen. Virilisierungerscheinungen bzw. eine Pseudopubertas praecox sind jedoch in diesen Fällen für gewöhnlich präsent.

Folgende Phänomene können zu einer eingeschränkten Wertigkeit der Labordiagnostik beim Cushing-Syndrom führen:

1. Kinder unter 3 Jahren zeigen u.U. noch keinen Cortisoltagesrhythmus (Hughes 1982)
2. Die Messung der 17-OH-Corticosteroide und der 17-ketogenen Steroide im Urin ist nicht genügend zuverlässig.
3. Die Vollständigkeit des 24-Stunden-Urins ist bei kleinen Kindern schwer zu sichern.
4. Das freie Urin-Cortisol kann bei adipösen Kindern erhöht sein (Hughes 1982). Andere Autoren bestreiten das (Diskussion 4.5.).
5. Die CPR ergibt, wenn man das Ergebnis auf die Kreatininausscheidung bezieht, klare Werte. Die Unschädlichkeit auch kleiner inkorporierter Mengen an Radioaktivität ist nicht erwiesen. Außer in Einzelfällen ist der Test für die Cushing-Diagnostik bei Kindern und Jugendlichen ungeeignet.
6. Cortisol als Stresshormon kann auch bei Traumata, akuten und chronischen Erkrankungen im Plasma erhöht sein (Streeten et al. 1969), ebenso kann die Tagesrhythmik gestört sein (Sholiton et al. 1961). Psychische Einflüsse wie z.B. Arztbesuch und Blutabnahme können gerade bei Kindern zu erhöhten Plasmacortisolspiegeln führen.
7. Bei normaler CPR aber verlangsamtem Glucocorticoid-Abbau wie bei Hypothyreose und Lebererkrankungen kann der Plasmacortisolspiegel erhöht sein. Thyreotoxikose führt zu einer erhöhten CPR ohne Cushing-Symptome, da der Cortisolabbau beschleunigt ist

(Cope und Black 1959).

8. Erhöhte Transcortin-Werte, z.B. bei Östrogen-medikation (Antikonzeptiva), führen zu erhöhten Plasma 17-OH-Corticosteroidspiegeln und erhöhten Plasmacortisolspiegeln im RIA (Foster und Dunn 1974), ohne daß der biologisch verfügbare Anteil erhöht ist (Streeten et al. 1969).

9. Die CPR und die 17-OH-Corticosteroide können bei adipösen Patienten erhöht sein (Schteingart et al. 1963).

1.4.3.1. Diagnostische Schwierigkeiten bei Adipositas

Klinisch milde Cushing-Syndrome sind erfahrungsgemäß auch im Labor am schwierigsten zu diagnostizieren. Die bei Kindern dabei am häufigsten auftretende Frage ist die Abgrenzung der alimentären Fettsucht von einer Störung der NNR-Funktion. Erschwert wird diese Diagnose durch den bei adipösen Kindern oft veränderten Glucocorticoidumsatz. Adipöse zeigen eine erhöhte CPR (Streeten et al. 1969), einen vergrößerten Glucocorticoid-Pool und eine beschleunigte Ausscheidung (Karl und Raith 1961, Mlynark et al. 1962, O'Connell et al. 1973). Eine Subpopulation der Fettsüchtigen zeigt niedrig-normale Plasmacortisolkonzentrationen (Mlynark et al. 1962), die andere Gruppe hat erhöhte Werte (Dunkelmann et al. 1964). Die bei Adipösen erhöhte CPR ist nicht mit dem Ausmaß des Übergewichts korreliert (Schteingart et al. 1963). Durch eine noch nicht geklärte Veränderung des Cortisolmetabolismus kommt es zu einer erhöhten Ausscheidung von 17-OH-Steroiden (Dunkelmann et al. 1964, Karl und Raith 1961, Migeon et al. 1963, Mlynark et al. 1962, O'Connell et al. 1973, Pinsker et al. 1968, Rosner et al. 1963). Der Anteil an Tetrahydrocortisol, allo-Tetrahydrocortisol oder Tetrahydrocortison im Urin bei Fettsüchtigen ist nicht verändert (O'Connell et al. 1973). Die Frage, ob die

Ausscheidung an freiem Cortisol im Urin erhöht ist, wird kontrovers beurteilt (siehe Diskussion unter Punkt 4.5.).

1.4.3.2. Hospitalisierung und Stress

Die Glucocorticoide als Stresshormone reagieren sowohl auf körperliche als auch auf seelische Belastungen. Vestergaard (1978) wies nach, daß Hospitalisierung eine Erhöhung der Glucocorticoidspiegel im Blut bewirkt. Mason (1965) zeigte diese Veränderungen eindrucksvoll an erhöhten Plasma- und Urin-17-OH-Corticosteroidwerten bei Erwachsenen sofort nach Aufnahme im Krankenhaus. Köbberling und v. z. Mühlen (1974) fanden erhöhte Werte an freiem Urincortisol bei erwachsenen hospitalisierten Patienten. Krieger et al. (1971) stellten einen normalen Cortisoltagesrhythmus im Plasma hospitalisierter Patienten fest.

1.4.3.3 Einfluß extraadrenaler Erkrankungen und Medikationen

Vor der Untersuchung der NNR müssen physiologische Veränderungen, Erkrankungen und Medikationen, die Einfluß auf den Plasma- und Urincortisolspiegel haben, ausgeschlossen werden. Zu erwähnen sind Schwangerschaft (Chattora] et al. 1976, Doe et al. 1960, Espiner 1966), Östrogenbehandlung, Thyreotoxikose (Hellmann et al. 1961) mit einer erhöhten CPR aber wegen des veränderten Abbaumusters (Phillipou 1982) fehlendem klinischen Cushing-Syndrom, interkurrente Infekte, chronische Erkrankungen wie Herzinsuffizienz, schwere Depressionen (Krieger et al. 1971), Hypertension (Burke und Roulet 1970) und Leberzirrhose (Zumoff et al. 1967).

1.5.1. Praktischer Stellenwert und Vorteile der Bestimmung des freien Urincortisols in der Cushing-Diagnostik

Die Bestimmung des freien Urincortisols wurde trotz seiner offensichtlichen diagnostischen Vorteile wegen methodischer Schwierigkeiten kaum routinemäßig durchgeführt. Erst seit hochspezifische Cortisol-antiseren zur Verfügung stehen gehört die Bestimmung des freien Urincortisols in einigen endokrinologischen Zentren zum Screeningprogramm bei Verdacht auf Störungen der NNR-Funktion. Die Bestimmung des freien Urincortisols erfordert nur eine Untersuchung und ist genügend zuverlässig, um in den meisten Fällen die am häufigsten gestellte Frage, alimentäre Fettsucht oder Cushing-Syndrom, zu beantworten. Die aufwendigeren Untersuchungen bleiben somit den unklaren Fällen und der Differentialdiagnose des Cushing-Syndroms reserviert. Das Sammeln eines 24-Stundenurins kann zuhause durchgeführt werden - manche Autoren sind sogar der Meinung, daß der Morgenurin genüge (Walker 1977) - und ersetzt die lästige Blutabnahme, die obendrein eine Stresssituation bedeutet und u. U. schon zu Erhöhungen des Plasmagluccorticoidspiegels führen kann. Besonders wichtig ist diese wenig belastende Methode bei Untersuchungen an Kindern.

Die Messung des Plasmacortisols ergibt nur einen momentanen Einblick in die NNR-Funktionslage. Das für einen Überblick über eine längere Zeitspanne aussagekräftigere Cortisoltagesprofil macht eine stationäre Aufnahme erforderlich. Das bedeutet neben der psychischen Belastung auch einen erheblichen zeitlichen und finanziellen Aufwand. Dazu kommen noch die vermehrten Kosten bei der Analyse mehrerer Proben.

Cope und Black (1959) waren die ersten, die die Bedeutung des freien Urincortisols unterstrichen. Seitdem wurde das freie Urincortisol von verschiedenen Autoren mit verschiedenen Methoden und Ergebnissen immer wieder bestimmt.

Voraussetzung für die Messung des freien Urincortisols sind Gegebenheiten des Cortisolmetabolismus, die neben den oben erwähnten praktischen Vorteilen, auch klare Funktionsaussagen der NNR-Funktionslage zu erlauben scheinen:

Der größte Teil des Plasmacortisols ist an Transcortin und Albumin gebunden. Nur der freie Anteil ist biologisch aktiv. Das Urincortisol reflektiert den ungebundenen, frei filtrierbaren Anteil des Plasmacortisols und ist somit unabhängig von veränderten Plasma-bindungsproteinen wie sie z.B. bei Östrogenmedikation usw. vorkommen. Wie das ungebundene Plasmacortisol ist auch sein im Urin entsprechender Parameter, das freie Urincortisol, unabhängig von der Cortisol-sekretionsrate und dem Turn-over der Glucocorticoide. Als Beispiel hierfür gilt der beschleunigte Umsatz von Cortisol und die kompensatorisch erhöhte Sekretionsrate (Gold und Crigler 1963) bei Thyreotoxikose. Hier sind sowohl die Sekretionsrate als auch die Urinmetaboliten erhöht, wogegen das freie Urincortisol normal ist.

In der Gruppe der Fettsüchtigen scheint das freie Urincortisol nicht verändert zu sein. Die Urinmetaboliten der Glucocorticoide zeigen jedoch erhöhte Werte, wahrscheinlich aufgrund einer erhöhten Abbaurate. Das Urincortisol zeigt bei Fettsüchtigen eine höhere und in die späteren Morgenstunden verlagerte maximale Cortisolausscheidung (Knorr und Lauter 1967). Die größte Bedeutung scheint die Messung des freien Urincortisols bei der definitiven Diagnose eines Cushing-Syndroms zu haben. Auch bei veränderten Plasmacortisolspiegeln und leicht erhöhten 17-OH-Corticosteroiden im Urin, die in der diagnostischen Grauzone liegen, scheint das freie Urincortisol eine

klare Abgrenzung zwischen Normalwerten und veränderten Werten bei NNR-Überfunktion zu zeigen (Ayres et al. 1957, Brooks et al. 1963, Burke und Beardwell 1973, Cope und Black 1959).

Als Erklärung für den Anstieg des freien Urincortisols dienen folgende Phänomene:

1. Nach Sättigung der Plasmaproteine mit Cortisol (Transcortin mit hoher Affinität und niedriger Kapazität und Albumin mit niedriger Affinität und hoher Kapazität) führt eine Erhöhung des Plasmacortisols zu einem schnellen Anstieg der freien Fraktion (Stolecke 1972) und somit zu einer Erhöhung der frei filtrierbaren Menge, obwohl ca. 85 % des filtrierten Cortisols tubulär reabsorbiert werden.
2. Beisel et al. 1964 zeigten, daß Glucocorticoidüberschuß im Blut zu einer erhöhten glomerulären Filtrationsrate und erhöhten Cortisolclearance gegenüber Gesunden führt.

1.5.2. Einfluß der Nierenfunktion auf die Ausscheidung des freien Urincortisols

Freies Cortisol und die nicht konjugierten Cortisolmetaboliten haben eine niedrige renale Clearance, da 80 - 90 % tubulär rückresorbiert werden (Beisel et al. 1964). Die Korrelation zwischen filtriertem Cortisol und der Urincortisolmenge ist linear (Vestergaard 1978). Konjugierte Cortisolmetaboliten dagegen haben eine Clearance, die nahezu der glomerulären Filtrationsrate entspricht, an Plasma-proteine gebundenes Cortisol ist nicht nierengängig.

Bei der Interpretation von Harnsteroidmessungen muß immer die Nierenfunktion berücksichtigt werden. Burke und Beardwell (1972) verglichen die Kreatinin-Clearance als Parameter der Nierenfunktion mit der Clearance des freien Cortisols. Die Clearances von freiem Cortisol und Kreatinin sind positiv korreliert. Jedoch ist diese

Korrelation nicht linear. Bei Nierengesunden beträgt die Clearance von ungebundenem Cortisol 4-36 ml/min. entsprechend 5-20 % der Kreatinin-Clearance. Erst bei einer Kreatinin-Clearance <20 ml/min, also bei einer schweren Niereninsuffizienz, sinkt die Clearance des Cortisols auf Werte <4 ml/min.

Eine leicht eingeschränkte Nierenfunktion erschwert also nicht die Beurteilung der freien Urincortisolwerte. Vorsicht bei der Interpretation ist erst bei schwerer Einschränkung der Nierenfunktion geboten.

2. Experimenteller Teil

2.1. Fragestellung

Die radioimmunologische Bestimmung des freien Urincortisols gehört in der Cushing-Diagnostik bei Erwachsenen zu den etablierten Methoden. Für Kinder und Jugendliche liegen dagegen keine größeren Untersuchungen vor.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war:

- a. Adaption eines im Labor des Dr. v. Haunerschen Kinderspitals etablierten RIAs zur Cortisolbestimmung im Plasma an die Untersuchung von Urinen.
- b. Aufstellung verbindlicher Referenzwerte für Kinder und Jugendliche.
- c. Untersuchung auf eventuelle Geschlechtsunterschiede.
- d. Korrelation des freien Urincortisols mit anderen Parametern (Alter, Körpergewicht, Körperoberfläche, Kreatininausscheidung).
- e. Vergleich der Wertigkeit der Untersuchung von Spontanurin gegenüber 24-Stundenurin.
- f. Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung von Urinextrakten mit den Ergebnissen der Untersuchung von Nativurin.
- g. Differenzierung von Normalen, Fettsüchtigen und Cushing-Patienten aufgrund ihrer Urincortisolmengen.
- h. Untersuchung des Einflusses von Hospitalisierung auf die Ausscheidung an freiem Urincortisol.

2.2. Versuchsbeschreibung

2.2.1. Probanden und Patienten

Zur Aufstellung von Referenzwerten wurde der 24-Stundenurin von 31 gesunden Kindern und Jugendlichen von 3 - 17 Jahren untersucht.

Die Diagnose "gesund" wurde präklinisch gestellt. Nach den Angaben der Mütter waren die Kinder weder akut und chronisch krank noch nahmen sie Medikamente ein.

Während der Sammelperiode lebten die Kinder daheim und waren keinen außergewöhnlichen Stress-Situationen ausgesetzt. Die Sammelgefäße wurden ihnen ins Haus gebracht und am nächsten Tag wieder abgeholt.

Die Körpergröße der Kinder wurde gemessen, und das Körpergewicht wurde mit einer, an den geeichten Waagen der Kinderklinik standardisierten Personenwaage bestimmt. Das Normalkollektiv lag in Größe und Gewicht innerhalb des dem Alter entsprechenden Normbereichs.

Abbildung 3 zeigt die Alters- und Geschlechtsverteilung der gesunden Kinder und Jugendlichen. Diese Gruppe bestand aus 19 Knaben und 12 Mädchen.



Abb.3: Alters- und Geschlechtszusammensetzung des Normalkollektivs.

■ = männlich; ● = weiblich
n=19 n=12

Um den Einfluß der Hospitalisierung zu untersuchen, wurde der 24-Stundenurin von 17 stationären, endokrinologisch unauffälligen Patienten kurz vor der Entlassung ohne akute Symptome im Stadium der Rekonvaleszenz untersucht.

Die Gruppe der Adipösen bestand aus 10 Patienten, die wegen ihrer Adipositas in die endokrinologische Sprechstunde des Dr. von Haunerschen Kinderspitals gekommen waren, und bei denen sowohl klinisch als auch labortechnisch ein Hypercortisolismus ausgeschlossen worden war. Die Kinder und Jugendlichen hatten keine Erkrankungen und standen unter keiner medikamentösen Therapie.

Die Diagnose Adipositas wurde aufgrund des klinischen Aspektes gestellt. Das Körpergewicht, das als Parameter für Adipositas nur mit Einschränkung verwertbar ist, lag nach der Schweizer Studie von Prader (Wachstumsstudie Zürich), bezogen auf die Körperlänge um 17 (grenzwertig), 47, 70 Perzentilen zu hoch, bzw. bei den übrigen 11 Kindern jenseits der 97. Perzentile.

Nach den Somatogrammen von Kunze und Murken (1974) lag das Gewicht der adipösen Patienten 20 % bis 60 % über den Normalwerten für Alter und Größe. Eine Patientin lag mit 19 % über dem Normalgewicht an der Grenze zur Adipositas. Die Gruppe der Cushing-Patienten bestand aus 4 Patienten, bei denen in Laboruntersuchungen eine Cortisol-Überproduktion diagnostiziert worden war. Von den Cushing-Patienten waren 3 ambulant. Eine Patientin hatte ein klinisch mildes Cushing-Syndrom, bei Zustand nach Entfernung eines Hypophysenadenoms. Die Cushing-Patienten waren zur Zeit des Urinsammelns nicht behandelt worden. Ein Patient war zur Entfernung eines NNR-Adenoms stationär aufgenommen worden. Sein Urincortisol war vor und während des stationären Aufenthaltes und nach Dexamethasongabe gemessen worden.

2.2.2. Das Sammeln eines 24-Stundenurins

Der Urin wurde über 24 Stunden in Plastikgefäßen ohne Zusatz gesammelt. Während des Sammelns und bis zur Weiterverarbeitung wurde der Urin kühl gelagert. Die Menge des 24-Stundenurins wurde mit Hilfe von Meßzylindern bestimmt (100 ml und 1000 ml Glasmeßzylinder). 20 ml Urin jeder Probe wurden in einem Plastikröhrchen aufbewahrt. Der Urin wurde entweder sofort verarbeitet oder bei -20°C tiefgefroren und vor der Verarbeitung langsam 12 Stunden im Kühlschrank aufgetaut. Eine Stunde vor Versuchsbeginn wurden die Proben dem Kühlschrank entnommen, sie hatten somit bei Verwendung Raumtemperatur. Die Stabilität des Cortisols ist bei dieser Vorgangsweise gewährleistet (Schöneshöfer et al. 1980b).

Die Mütter bzw. die älteren Kinder und Jugendlichen waren genau über das Sammeln eines 24-Stundenurins instruiert worden. Als Hilfskonstruktion zur Festlegung des Sammelbeginns diente der Morgenurin des 1. Tages: Der Morgenurin des 1. Tages wurde verworfen, gleichzeitig wurde der Zeitpunkt aufgeschrieben und als Sammelbeginn bezeichnet. Nun wurde der gesamte über den Tag und die Nacht produzierte Urin einschließlich des Morgenurins (möglichst genau 24 Stunden nach Sammelbeginn) in einem Plastikgefäß aufgefangen. Der Zeitpunkt des Morgenurins wurde zur Vollständigkeitskontrolle aufgeschrieben.

Nach Aussage der Mütter bzw. der Kinder und Jugendlichen wurde das 24-Stundenintervall bis auf ± 30 Minuten genau eingehalten.

Bei 19 der gesunden Kinder wurde der Urin portioniert gesammelt, d. h. die Kinder benutzten jedesmal zum Wasserlassen ein neues Plastikgefäß. Die Zeiten, die nicht standardisiert waren, wurden notiert.

Das Urinkreatinin wurde im Labor für klinische Chemie des Dr. v. Haunerschen Kinderspitals mit der Methode nach Jaffe (1886) bestimmt. Es diente u. a. als Parameter

für die Vollständigkeit des 24-Stundenurins, auch wenn es hierfür nur ein grobes Maß sein kann.
Die Körperoberfläche wurde nach der Formel von Haycock et al. (1978) berechnet.

2.3. Methodik

2.3.1. Verwendete Reagenzien

Hydrocortison für biochemische Zwecke E. Merck, Darmstadt

Kontrollseren

Kontrollurin

Aqua bidestillata

^3H -Cortisol, (1,2,6,7- $^3\text{H}(\text{N})$)-Hydrocortisone, New England Nuclear, Dreieich

Quickszint 402 Koch Light Laboratories Ltd., Zinsser, Frankfurt

Dichlormethan zur Analyse E. Merck, Darmstadt

Tetrachlorkohlenstoff zur Analyse E. Merck, Darmstadt

Äthanol absolut Baker Chemikalien, Groß-Gerau

2.3.2. Lösungen

Phosphatpuffer: pH 7,2

2,686 g KH_2PO_4 zur Analyse E. Merck, Darmstadt

8,356 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ zur Analyse E. Merck, Darmstadt

0,325 g NaN_3 zur Analyse E. Merck, Darmstadt

Aqua bidestillata ad 1 000 ml

haltbar über 6 Monate bei $+4^\circ \text{C}$

Dextran-Aktivkohle-Suspension:

500 mg Norit A (dialysiert) SERVA Heidelberg

50 mg Dextran T70, Pharmacia fine Chemicals, Uppsala,
Phosphatpuffer ad 1000 ml

haltbar über 1 Woche bei + 4° C

Cortisolstammlösung

4 g Cortisol in 100 ml Äthanol entsprechend

4000 µg/100 µl;

davon 100µl auf 2 ml Äthanol

Phosphatpuffer ad 100 ml entsprechend 4000 pg/100 µl

Eichlösungen

a) 125 µl Stammlösung ad 20 ml Phosphatpuffer
entsprechend 25 pg Cortisol/100 µl Lösung

b) 250 µl Stammlösung ad 20 ml Phosphatpuffer
entsprechend 50 pg Cortisol/100 µl Lösung

c) 375 µl Stammlösung ad 20 ml Phosphatpuffer
entsprechend

75 pg Cortisol/100 µl Lösung

d) 500 µl Stammlösung ad 20 ml Phosphatpuffer
entsprechend 100 pg Cortisol/100 µl Lösung

e) 1 ml Stammlösung ad 20 ml Phosphatpuffer
entsprechend 200 pg Cortisol/100 µl Lösung

f) 1,5 ml Stammlösung ad 20 ml Phosphatpuffer
entsprechend 300 pg Cortisol/100 µl Lösung

g) 2,0 ml Stammlösung ad 20 ml Phosphatpuffer
entsprechend 400 pg Cortisol/100 µl Lösung

h) 3,0 ml Stammlösung ad 20 ml Phosphatpuffer
entsprechend 600 pg Cortisol/100 µl Lösung

i) 4,0 ml Stammlösung ad 20 ml Phosphatpuffer
entsprechend 800 pg Cortisol/100 µl Lösung

j) 5,0 ml Stammlösung ad 20 ml Phosphatpuffer
entsprechend 1000 pg Cortisol/100 µl Lösung

haltbar über 2 Monate bei + 4° C

Cortisol-Antiserum Nr. 11/28.1.1978

(Endokrinologisches Labor, Dr. v. Haunersches Kinderspital der Universität München)

Das Antiserum wurde mit gammaglobulinhaltigem Phosphatpuffer auf 1:40000 verdünnt.

Die Haltbarkeit der Lösung beträgt 2 Monate bei $+4^{\circ}\text{C}$.

^3H -Cortisol-Lösung

^3H -Cortisol wird unter Stickstoff zur Trockne abgedampft. Der trockne Rückstand wird mit Phosphatpuffer verdünnt, bis 100 μl 13000 - 14000 Counts/Minute ergeben.

Die Haltbarkeit der Lösung beträgt 2 Monate bei $+4^{\circ}\text{C}$.

^3H -Cortisolwiederfindung

Vorgereinigtes radioaktiv-markiertes Cortisol wird analog der ^3H -Cortisol-Lösung abgedampft und verdünnt, bis 100 μl 1300 - 1400 Counts/Minute entsprechen.

Die Haltbarkeit der Lösung beträgt 2 Monate bei $+4^{\circ}\text{C}$.

2.3.3. Geräte

Szintillationsgefäße Zinsser, Frankfurt

Liquid-Szintillation-Spectrometer, Betaszint 5000,
Bertold-Friesecke, Wildbad

Tischzentrifuge, Hettich Rotanta/S, Tuttlingen

Kühlzentrifuge, Hettich Roto Silenta/k, Tuttlingen

Alle verwendeten Glasgeräte wurden vor Gebrauch mit Methanol gereinigt und bei 400°C Celsius sterilisiert, um verunreinigende Steroide zu zerstören.

2.3.4. Versuchsbedingungen

Die Grundlagen des Radioimmunoassays wurden schon in 1.3.4. dargelegt.

2.3.5. Antiserum

Verwendet wurde das Cortisol-Kaninchen-Antiserum Nr. 11 (28.1.1978)

Cortisol als niedrigmolekulare Substanz induziert keine Antikörperbindung. Um es zum Vollantigen zu machen, muß es an eine hochmolekulare Substanz, z. B. Albumin gekoppelt werden. Die Auswahl der Bindungsstelle beeinflusst die Spezifität.

Bei dem im Versuch verwendeten Antiserum wurde die Ketogruppe an C₃ über ein Carboxymethyloxim an bovines Serumalbumin gekoppelt. Mit dem so erhaltenen Cortisol-C₃-CMO-BSA wurden nun Kaninchen immunisiert. Der dadurch erzeugte Antikörper hat folgende Spezifität:

Cortisol	100 %
Cortison	10 %
17-OH-Progesteron	2 %
Progesteron	1 %
Androstendion	} <0,01 %
Testosteron	
Dihydrotestosteron	
Dehydroepiandrosteron	
Östron	
Östradiol	
Östriol	

Der Antikörper wurde mit gammaglobulinhaltigem Phosphatpuffer (1 mg Gammaglobulin vom Rind pro ml Puffer) auf einen Titer von 1:40000 verdünnt, entsprechend einer Bindung des eingesetzten

^3H -Cortisols von ca. 50 % (Auchter 1978, Sokolowski und Wood 1981).

2.3.6. Eichkurve

2.3.6.1. Empfindlichkeit der Eichkurve

Nach Ekins (Sokolowski und Wood 1981) bezeichnet man als Empfindlichkeit eines Testsystems die kleinste Substanzmenge, die in dem Versuch gemessen werden kann, d.h. die Konzentration an zu bestimmendem Antigen, die sich statistisch signifikant von 0 unterscheidet. Beim RIA berechnet man die Empfindlichkeit durch Mehrfachbestimmung des jeweiligen Nullstandards, Berechnung des Mittelwertes und der 2-fachen Standardabweichung. Die Empfindlichkeit ist nicht nur von der Präzision der Nullstandardbestimmung, sondern auch von der Steilheit der Standardkurve abhängig.

Bei einer Antikörperverdünnung, die 50 % des radioaktiv-markierten Antigens bindet, liegt die Standardkurve erfahrungsgemäß in einem günstigen Bereich. Wenn die prozentuale Bindung des radioaktiv-markierten Antigens höher wird, dann wird die Eichkurve flacher, d. h. die Messung wird unempfindlicher. Analog wird die Eichkurve steiler, wenn die prozentuale Bindung des radioaktiv-markierten Antigens an den Antikörper niedriger ist. In diesem Fall ist der Versuch zwar empfindlicher, der Bereich, in dem die Messung möglich ist, wird jedoch kleiner. Durch den Grad der Verdünnung des Antikörpers kann also die Empfindlichkeit beeinflusst und den jeweiligen Bedingungen angepaßt werden.

2.3.6.2. Erstellung der Eichkurve

Zur Erstellung der Eichkurve wurden Eichlösungen mit je 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000 pg Cortisol/100 µl Phosphatpuffer hergestellt. Jeder Wert der Eichkurve wurde dreifach bestimmt, der Nullstandard vierfach. Per Computerprogramm wurde aus den 11 Standardwerten eine sigmoide Kurve berechnet, die alle Standardpunkte durch eine Kurve 3.Ordnung $y=a+bx+cx^2+dx^3$ verband. Danach führte der Computer eine Glättung des Kurvenverlaufs durch, so daß eine glatte sigmoide Kurve mit einem Wendepunkt entstand. Die Konzentration der Proben wurde anhand der Eichkurve errechnet. Die Konzentration im Ausgangsurin wurde durch Einbeziehung der Verdünnung und der radioaktiven Wiederfindung (recovery) erhalten.

In einem typischen Assay lag die Standardabweichung der Eichpunkte zwischen 0,2 % und 2 % für die einzelnen Werte.

Der Meßbereich der zu bestimmenden Proben wurde zwischen 50 pg/100 µl und 800 pg/100 µl gewählt. Werte, die im Bereich zwischen 0 und 50 pg/100 µl und > 800 pg/100 µl lagen, wurden noch einmal mit größerem eingesetzten Volumen bzw. kleinerem Volumen oder größerer Verdünnung gemessen.

2.3.7. Versuch

2.3.7.1. Versuchsprinzip

Um den Einfluß störender Begleitstoffe im Urin auf die Meßergebnisse und ihre Interpretierbarkeit zu untersuchen, wurde jeder zu untersuchende Urin zweimal per RIA gemessen. Einmal nach Vorreinigung per Extraktion, zum zweiten Mal durch Einsetzen von völlig

unbehandeltem Urin direkt in den RIA. Jede Probe wurde doppelt bestimmt.

2.3.7.2. Versuchsablauf

Die Methode entsprach dem im Dr. von Haunerschen Kinderspital entwickelten und standardisierten RIA für Plasma-Cortisol und wurde an die Gegebenheiten im Urin adaptiert.

In Extraktionsgläser mit Schliffstopfen wurden je 25 µl bzw. 50 µl oder 50 µl 1:5 verdünnter Urin mit 100 µl Aqua destillata und 100 µl ^3H -Cortisol (1300 cpm) zur Kontrolle von Aufbereitungsfehlern gut gemischt und über 30 Minuten bei $+4^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Danach wurden die Proben mit 4 ml Dichlormethan über 5 Minuten durch Schütteln per Hand extrahiert und 1 Minute lang zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Je 2 ml des steroidhaltigen Dichlormethanextraktes wurden in neue Extraktionsgläser abpipettiert und unter dem Abzug unter Luftstrom zur Trockne eingedampft.

Der trockne Rückstand jeder Probe wurde in 500 µl Phosphatpuffer aufgelöst und danach mit 4 ml Tetrachlorkohlenstoff 5 Minuten durch Schütteln extrahiert. Nach einminütiger Zentrifugation wurden je 100 µl der oberen, wäßrigen Phase in 2 Röhrchen für den RIA und in ein Szintillationsgefäß mit 8 ml Szintillationsflüssigkeit zur Bestimmung der Wiederfindung (recovery) pipettiert.

Zur Erstellung der Eichkurve wurden 4x100 µl Puffer, je 3x100 µl der Eichlösungen mit 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000 pg in Glasröhrchen pipettiert. Die Proben und die Eichlösungen wurden nun mit 100 µl ^3H -Cortisol und 500 µl Cortisol-Antikörper vermischt und über 2 Stunden in Eiswasser inkubiert.

Anschließend wurden in jedes Röhrchen 500 µl Kohle-Dextran-Suspension (Murphy 1967) gegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation im Eisbad wurden die Proben weitere 10 Minuten bei $+ 4^{\circ} \text{C}$ in der Kühlzentrifuge zentrifugiert.

Der Überstand wurde in Szintillationsgefäße mit 8 ml Szintillationsflüssigkeit abgekippt, und die Impulse jeder Probe wurden im Counter solange gemessen bis 10000 Counts erreicht wurden. Der statistische Zählfehler lag bei 10000 gemessenen Counts im Bereich von 1%.

Die Ergebnisse wurden mit Spline-Approximation per Computerprogramm ausgewertet. Die radioaktive Wiederfindung (recovery) wurde bei der Berechnung berücksichtigt.

Bei stark erhöhten Konzentrationen, die nicht mehr an der Standardkurve abgelesen werden konnten, wurden die Proben 1:5 verdünnt und die Bestimmung wiederholt. Zur Bestimmung von ungereinigtem Urin wurden 50 µl bzw. 100 µl von 1:100 verdünntem 24-Stundenurin verwendet.

2.3.7.3. Extraktion

Extraktionsschritte vor der Bestimmung des freien Urincortisols werden allgemein für nötig gehalten (Apter et al. 1975; Ruder et al. 1972; Schöneshöfer et al. 1980a, 1980b). Begründet wird diese Forderung damit, daß das freie Cortisol nur 1 % der Cortisolmetaboliten im Urin darstellt und ein großer Teil der konjugierten Abbauprodukte eine ähnliche chemische Konfiguration wie Cortisol aufweist und somit Kreuzreaktionen zu erwarten sind (Vestergaard 1978). Die Extraktion mit Dichlormethan und anschließender Verteilung zwischen Wasser und Tetrachlorkohlenstoff ist eine der gebräuchlichsten Methoden zur weitgehenden Entfernung anderer im Urin vorhandenen Steroide (Hsu und Bledsoe 1970). Bei einfacher Dichlormethanextraktion

werden die konjugierten Steroide entfernt. Der Reinigungsschritt mit Tetrachlorkohlenstoff entfernt Steroide, die weniger polar sind als Cortisol. Ob jedoch die Spezifität der Cortisolbestimmung durch die zweite Extraktion mit Tetrachlorkohlenstoff wesentlich verbessert werden kann, ist umstritten (Schöneshöfer et al. 1980a), da der Antikörper zu spezifisch ist, um diese durch Tetrachlorkohlenstoff extrahierten Substanzen zu binden.

Den Hauptteil der spezifischen Interferenzen verursachen jedoch Substanzen mit einer ähnlichen Polarität wie Cortisol, die durch Lösungsmittel-extraktion nicht entfernt werden können (Demers und Derck 1977, Juselius und Barnhart 1974, Schöneshöfer et al. 1980b). Wegen dieser noch nicht näher definierten Substanzen mit einer dem Cortisol ähnlichen Polarität, wird von mehreren Untersuchern eine weitergehende chromatographische Vorreinigung gefordert.

Gegen diese aufwendigere Vorreinigung spricht jedoch die Vermutung, daß die Höhe der Interferenzen von einem veränderten Cortisolmetabolismus abhängig sein könnte (Vestergaard 1978). Somit könnten beim Cushing-Syndrom signifikant höhere Werte gefunden werden, woraus eine deutlichere Unterscheidung zwischen Gesunden und Kranken resultieren könnte.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei einer einfachen Extraktion mit Dichlormethan und Verteilung zwischen Wasser und Tetrachlorkohlenstoff zwar keine spezifische Messung des freien Urincortisols zu erwarten ist, daß aber bei dieser Reinigungsmethode eine repräsentative Aussage über die NNR-Funktionslage gewährleistet sein soll.

2.3.7.4. Wiederfindung (recovery)

Zur Kontrolle von Extraktionsverlusten wurden den Proben vor der Extraktion jeweils 100 µl ^3H -Cortisol entsprechend 1300 cpm zugefügt. Vor dem RIA wurde in einem Aliquot des Extraktes die wiedergefundene Radioaktivität gemessen. Die Wiederfindung wurde in Prozent der Ausgangsradioaktivität berechnet, und das Ergebnis jeder Probe wurde gemäß dem Verlust korrigiert. Die Wiederfindung nach Extraktion betrug im Mittelwert 92 % bei einer Streubreite von 81 % - 108 %. Der Variationskoeffizient betrug 6,6 %. Diese Wiederfindung entsprach den Ergebnissen bei unterschiedlichen Untersuchungsmethoden von Deck et al. 1976, Juselius und Barnhart 1974, Murphy 1968, Ratcliff und Hall 1973, Schöneshöfer et al. 1980b, Walker 1977 und lag weit höher als bei Ayres et al. 1957, Gerdes und Teller 1967, Ruder et al. 1972, Stolecke 1970.

2.3.8. Vorversuche

Der verwendete RIA wurde im Dr. von Haunerschen Kinderspital standardisiert und über Jahre zur Messung von Cortisol im Plasma verwendet. Er wurde ständig nach den Kriterien der statistischen Qualitätskontrolle überprüft. Interne und externe Qualitätskontrollen waren zufriedenstellend. Somit war es nicht notwendig alle Schritte neu zu überprüfen.

2.3.8.1. Ausschluß von Zeit- und Temperaturfaktoren auf die Bindung des Antikörpers an das Antigen

Der Antikörper wurde den einzelnen Proben jeweils nach 4, 8, 12, 16, 20 Minuten bei Zimmertemperatur zugegeben. Erst nach Zugabe des Antikörpers zur letzten Probe nach 20 Minuten wurden alle Proben gemeinsam für 2 Stunden in

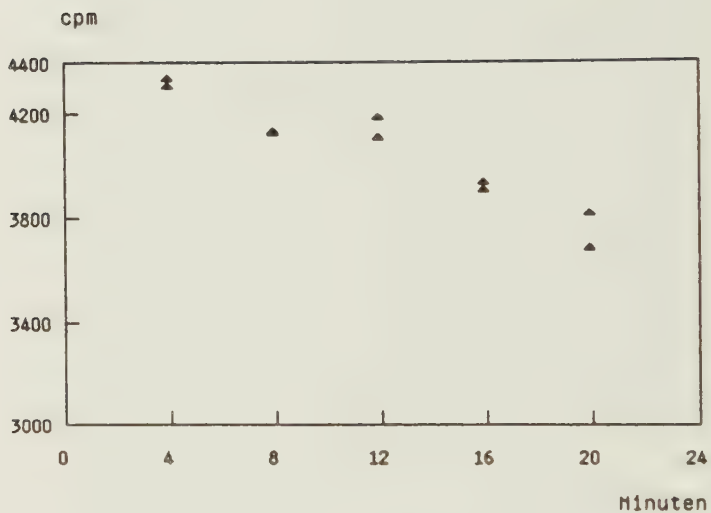


Abb. 4:

Zählausbeute abhängig vom Zeitpunkt der Antikörperzugabe bei konstanter Inkubationszeit.

Eiswasser inkubiert.

Bei Zimmertemperatur kam es zu einer schnellen Bindung des Antikörpers an das Antigen (Abb.4). In dem Versuch blieb dieser Bindungsunterschied zwischen dem ersten und dem letzten Röhrchen trotz der 2,5-stündigen Inkubationszeit bestehen. Um Temperatur- und Zeiteinflüsse möglichst gering zu halten, wurde der Antikörper den in Eiswasser gekühlten Proben zugegeben und versucht, die Zeitspanne zwischen Beschickung des ersten und letzten Röhrchens mit Antikörper möglichst klein zu halten. Der zeitliche Unterschied der Antikörperzugabe von der ersten bis zur letzten Probe betrug höchstens 7 Minuten.

2.3.8.2. Einfluß der Inkubationszeit auf die Antigen-Antikörperbindung

Um den Einfluß der Inkubationszeit auf die Bindung zu untersuchen, wurden verschiedene Inkubationszeiten zwischen 30 Minuten und 24 Stunden überprüft.

Zu 100 µl Puffer und 100 µl ^3H -Cortisol wurden je 500 µl Antikörper zugegeben. Nach der Inkubationszeit wurden die freien Antigene von den Antigen-Antikörper-Komplexen per Dextran-Kohle-Suspension getrennt. Zu jedem Zeitpunkt wurden 4 Proben bestimmt. Abbildung 5 zeigt die Zählausbeute der Proben nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

Zusätzlich wurde, um Einflüsse des Zeitunterschieds zwischen Beschickung des ersten und letzten Röhrchens mit Antikörper auszuschließen, der Antikörper und später die Kohle-Suspension nach folgendem Pipettierschema zugegeben.

1 2 3 4 5.....
1 2 3 4 5.....
1 2 3 4 5.....
1 2 3 4 5..... usw.

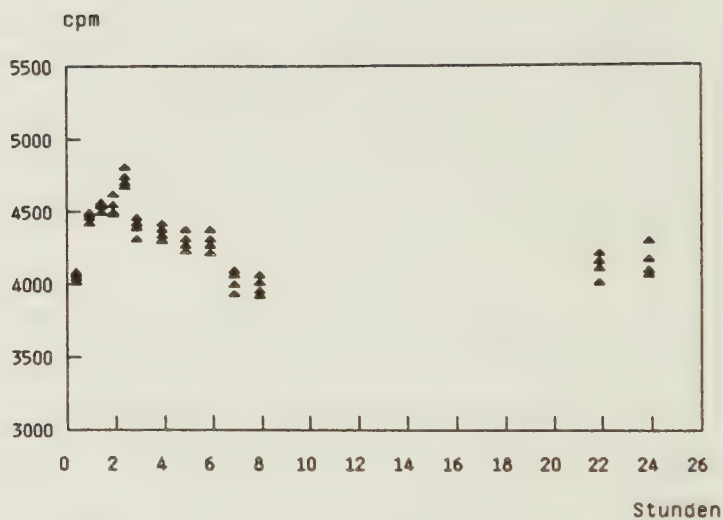


Abb. 5:

Zählausbeute nach unterschiedlichen Inkubationszeiten, 4-fache Bestimmung jeden Wertes.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Meßwerten eines Zeitpunktes wurde nicht gefunden. Analog den Ergebnissen von Auchter (1978) und Foster & Dunn (1974) kam es bei Veränderung der Inkubationszeit kaum zu unterschiedlichen Ergebnissen.

Zwischen 1 und 3 Stunden waren die Meßwerte konstant (Abb. 5), ab der 4. Stunde kam es zu einer leichten Abnahme der Antigen-Antikörper-Komplexbildung. Die Abnahme entspräche $<25 \text{ pg}/100 \text{ }\mu\text{l}$, wenn die Standards 8 Stunden kürzer inkubiert würden. Da Proben und Standards beim üblichen Versuch jedoch gleich behandelt wurden konnte es zu keinen fehlerhaften Messungen kommen. Für den verwendeten RIA wurde eine Inkubationszeit zwischen 1,5 und 3 Stunden eingehalten. Für den Routinegebrauch könnte man die Inkubationszeit jedoch bis zu 24 Stunden ausdehnen, ohne Beeinträchtigungen der Meßergebnisse befürchten zu müssen.

2.3.8.3. Einfluß der Verdünnung und des eingesetzten Volumens auf die Bestimmung

Um das günstigste zu untersuchende Probenvolumen für den RIA mit Extraktion zu finden, wurden in mehreren RIAs verschiedene Volumina des Kontrollurins eingesetzt. Ziel war herauszufinden, welche Volumina im günstigsten Bereich der Eichkurve lagen, und ob bei unterschiedlichen Probenvolumina der Einfluß unspezifischer, im Urin enthaltener Stoffe zu disproportionalen Interferenzen führen würde.

Für die radioimmunologische Analyse des nicht extrahierten Urins wurde der Kontrollurin verschieden hoch verdünnt und außerdem unterschiedliche Probevolumina eingesetzt.

Zur Überprüfung des Einflusses in den RIA eingesetzter, unterschiedlicher, verdünnter Urinvolumina und unterschiedlicher Verdünnungen wurden folgende Versuche

gemacht.

1. Ein Kontrollurin wurde in verschiedenen Stufen verdünnt (1:25 bis 1:200). Von diesen Verdünnungen wurden unterschiedliche Mengen in den Assay eingebracht. Die Verdünnungen, die Volumina an eingesetztem verdünntem Urin, und die Ergebnisse der einzelnen Messungen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1: Ergebnisse der Konzentration an freiem Urincortisol im Kontrollurin bei unterschiedlichen Verdünnungen und unterschiedlichen eingesetzten Volumina des verdünnten Urins

	Verdünnung	μl Urin	$\mu\text{g/dl}$
1	1:25	10	24,5
2	1:25	25	26,3
3	1:50	25	25,4
4	1:50	50	23,6
5	1:100	50	23,3
6	1:100	100	24,5
7	1:150	100	28,2
8	1:150	150	26,9
9	1:200	100	27,4
10	1:200	200	26,6

Mittelwert ($\bar{x}$) = 25,7 $\mu\text{g/dl}$

Standardabweichung (SD) = 1,66 $\mu\text{g/dl}$

Variationskoeffizient (VK) = 6,46 %

2. Von einem 1:100 verdünnten Kontrollurin wurden 2 unterschiedliche Volumina (50 μl und 100 μl) in den Assay eingeführt.

In dem Versuch sollte überprüft werden, ob etwaige im Urin enthaltene interferierende Substanzen bei höheren eingesetzten Volumina zu höheren Ergebnissen führten.

Die eingesetzten Volumina und die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Um den Einfluß des eingesetzten Gesamtvolumens zu überprüfen, wurden einmal 50 µl von 1:100 verdünntem Urin in den Assay eingeführt, das andere mal wurde zu 50 µl von 1:100 verdünntem Urin 50 µl Puffer gegeben und in den Assay eingesetzt (Tab. 2).

Tab. 2: Ergebnisse der Konzentration an freiem Urincortisol im Kontrollurin beim Einsatz von 50 µl und 100 µl an 1:100 verdünntem Urin, bzw von 50 µl an 1:100 verdünntem Urin + 50 µl Puffer

	<u>µl Urin</u>	<u>µl Puffer</u>	<u>µg/dl</u>
1	50		24,30
2	50		24,61
3	50		29,37
4	50	50	25,16
5	50	50	24,49
6	50	50	27,38
7	100		25,21
8	100		26,57
9	100		23,37

Anhand der ermittelten Werte aus Tabelle 1 und 2 ist zu sehen, daß die Abweichungen der einzelnen Messungen zufallsverteilt waren und sich nicht signifikant unterschieden.

Somit konnte gezeigt werden, daß die Messung von den Verdünnungsstufen und Volumina in dem gewählten Bereich unabhängig ist.

Nach diesen Vorversuchen setzten wir in den RIA mit Extraktion 25 bzw. 50 µl des zu untersuchenden Urins ein. Das eingesetzte Volumen wurde unter Beachtung der 24-Stundenurinmenge ausgewählt, d. h. bei niedrigem 24-Stundenurinvolumen 25 µl, bei hohem 24-Stundenurinvolumen 50 µl. In zahlreichen Fällen wurden beide

Volumina eingesetzt, zwischen den Ergebnissen bei verschiedenen Volumina konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Für den RIA ohne Extraktion wurden 100 µl von 1:100 verdünntem Urin eingesetzt. Bei zu hohen Konzentrationen wurden die Proben auf 1:200 verdünnt und 100 µl in den Assay eingebracht. Bei zu niedrigen Konzentrationen wurden 200 µl (Verdünnung 1:100) eingesetzt oder der Urin auf 1:50 verdünnt und 100 µl verwendet.

2.4. Qualitätskontrollen

2.4.1. Ausgangsbindung und 50 % Interceptpunkt

Zur ständigen Überwachung der Empfindlichkeit des Testsystems diente die Ausgangsbindung (B_0/T), die per 4fach Bestimmung des B_0 -Standards (Nullstandard, Antikörper und radioaktiv-markiertes Cortisol) und Doppelbestimmung der eingesetzten Gesamtaktivität errechnet wurde. Die Ausgangsbindung lag bei den einzelnen RIAs zwischen 40 % und 50 %. Bei plötzlichem starken Abfall der Ausgangsbindung, entsprechend einer Qualitätsverschlechterung des Testsystems, wurden die Eichlösungen, die Tracerlösungen und die Antikörperverdünnung neu angesetzt. Der Versuch wurde wiederholt. Der 50 % Interceptpunkt ($B/B_0 \times 100 = 50\%$) lag konstant im steilsten Bereich der Eichkurve zwischen 200 pg/100 µl und 400 pg/100 µl.

2.4.2. Untere Nachweisgrenze

Der Berechnung der unteren Nachweisgrenze wurde die 2-fache Standardabweichung der Streuung der 4-fach-Bestimmung am Nullpunkt der Kurve zugrunde

gelegt. Setzt man die im Nullpunkt gebundene Radioaktivität als 100% ein, so entsprachen 2 Standardabweichungen der 4-fach Bestimmung höchstens 4%. Der, an dem Punkt 80-2 Standardabweichungen, an der Kurve abgelesene Wert entsprach der geringsten Menge, die von 0 zu unterscheiden war.

Die untere Nachweisgrenze betrug in dem verwendeten Assay, bei Einsatz der üblichen Mengen, höchstens 12,5 pg/100 μ l. Bezogen auf die 24-Stunden-Ausscheidung an freiem Urincortisol entsprach dies bei einem Urinsammelvolumen von 500 ml einer Cortisolmenge von 1,25 μ g/die, bei einem Volumen von 2000 ml einer Cortisolmenge von 5 μ g/die.

2.4.3. Intraassayvariabilität

Zur Berechnung der Intraassayvariabilität (Präzision in der Serie) wurde eine Urinprobe 7mal mit Extraktionsschritten und 7mal ohne Vorreinigung bestimmt. Für den RIA mit Extraktion wurden 50 μ l Urin eingesetzt, für den RIA ohne Extraktion 100 μ l von 1:100 verdünntem Urin (Tab. 3).

Die Variationskoeffizienten von 9,95 % beim RIA mit Extraktion und von 3,73 % beim RIA ohne Extraktion, erfüllten die bei RIAs geforderten Qualitätsansprüche.

Tab. 3: Ergebnisse einer 7-fach-Bestimmung des Kontrollurins im RIA mit Extraktion und im RIA ohne Extraktion

<u>RIA extrahiert</u>	<u>RIA nicht extrahiert</u>
<u>µg/dl</u>	<u>µg/dl</u>
7,22	24,97
6,31	26,80
7,97	25,31
5,98	23,91
6,87	26,32
7,54	25,27
6,73	25,91
$\bar{x} = 6,95 \text{ µg/dl}$	$\bar{x} = 25,5 \text{ µg/dl}$
$SD = 0,69 \text{ µg/dl}$	$SD = 0,95 \text{ µg/dl}$
$VK = 9,95 \%$	$VK = 3,73 \%$

2.4.4. Interassayvariation

Um die Interassayvariation, d.h. die Präzision von Tag zu Tag, beurteilen zu können, wurden in jedem RIA mehrere Kontrollproben mitgeführt.

Als Kontrollen im RIA mit Extraktion dienten 25 µl und 50 µl eines Kontrollurins (KU) und, da der RIA für Plasma bereits erprobt und standardisiert war, 25 µl und 50 µl eines Kontrollserums (KS) (Tab.4).

Zur Berechnung der Präzision im RIA ohne Extraktion wurden in jedem Assay 50 µl und 100 µl des auf 1:100 verdünnten Kontrollurins bestimmt (Tab. 5).

Der Interassayvariationskoeffizient lag sowohl für den Assay mit extrahiertem Urin als auch den RIA ohne Extraktion unter der 10 % Grenze und genügte somit den, von der Bundesärztekammer festgelegten, Richtlinien (1970).

Tab. 4: Interassayvariation des RIA mit Extraktion anhand der Ergebnisse eines mitgeführten Kontrollurins (KU) und eines Kontrollserums (KS)

	25µl KU	50µl KU	25µl KS	50µl KS
	µg/dl	µg/dl	µg/dl	µg/dl
1	7,19	7,40	10,48	10,80
2	6,79	6,28	10,18	11,52
3	7,88	7,36	10,32	11,02
4	6,04	6,42	11,06	10,75
5	8,27	7,90	10,88	12,44
6	8,47	7,91	10,00	10,49
7	7,50	6,89	10,74	11,01
8	7,02	6,59	11,40	10,71
9	7,96	8,24	12,20	11,60
10	7,90	6,51	11,74	10,93
11	7,99	7,49	10,86	10,04
12	7,52	6,55	10,07	10,89
13	6,37	5,91	10,29	11,18
14	6,68	7,23	10,94	11,03
15	7,40	7,70	10,18	10,44
16	7,98	6,84	10,30	10,20
17	6,93	7,20	11,27	10,83
18	7,98	7,30	12,03	11,50
19	6,30	7,29	10,81	10,95
20	7,91	6,82	10,70	11,37
21	7,10	7,97	10,56	10,98
$\bar{x}$ =	7,39 µg/dl	7,13 µg/dl	10,8 µg/dl	11,0 µg/dl
SD =	0,69 µg/dl	0,62 µg/dl	0,64 µg/dl	0,54 µg/dl
VK =	9,33 %	8,73 %	5,96 %	4,89 %

Tab. 5: Interassayvariation im Ria ohne Extraktion
anhand der Ergebnisse eines 1:100 verdünnten in jedem
Assay mitgeführten Kontrollurins

	<u>50µl KU</u>	<u>100µl KU</u>
	µg/dl	µg/dl
1	27,18	26,43
2	22,98	24,32
3	25,47	25,50
4	25,18	23,45
5	24,25	22,82
6	25,44	25,73
7	25,18	24,32
8	24,80	26,30
9	24,40	25,42
10	26,22	22,27
11	22,78	22,73
12	20,91	25,21
13	27,30	25,70
14	27,91	26,59
15	26,30	27,36
16	24,55	25,20
17	24,49	26,03
18	25,41	26,70
19	25,90	27,04
20	25,80	27,30
21	26,20	25,23
22	23,72	24,21
23	25,27	25,11
$\bar{x}$ =	25,1 µg/dl	25,3 µg/dl
SD=	1,56 µg/dl	1,46 µg/dl
VK=	6,23 %	5,76 %

2.4.5. Kontrolle des Testsystems auf Verunreinigung

Um Kontamination der verwendeten Gläser, Pipetten, Lösungen und Geräte mit Cortisol auszuschließen oder zu erkennen, wurde in jedem RIA ein Leerwert (Blank) mitgeführt, bei dem anstelle des Probevolumens 100 µl Aqua destillata eingesetzt wurde.

Die auf diese Weise gewonnenen doppeltbestimmten Blankwerte unterschieden sich nicht signifikant von den Nullwerten. Eine Verunreinigung von Geräten und Reagenzien konnte somit ausgeschlossen werden.

2.4.6. Kontrolle der Eichkurve im höheren Bereich

Zur Kontrolle der Eichkurve im höheren Bereich wurde in jedem RIA mit Extraktion eine Probe mit 100 µl einer Cortisolösung von einer Konzentration von 400 µg/dl mitgeführt. Analog wurde dem RIA ohne Extraktion zur Kontrolle der Eichkurve im höheren Bereich des Meßsystems und zum Ausschluß einer falschen Verdünnung bei der Herstellung der Eichlösungen, 100 µl von 1:100 verdünnter, standardisierter Cortisolösung mit 400 µg/dl zugefügt, als auch 50 µl von 1:10 verdünnter Cortisolösung mit 400 µg/dl (Tab. 6).

Aus den Variationskoeffizienten ging hervor, daß der Assay auch in höheren Bereichen der Eichkurve den Qualitätsanforderungen genügte.

Tab. 6: Ergebnisse der Bestimmung einer standardisierten Cortisolösung (400µg/dl) in den durchgeführten RIAs

	<u>RIA extrahiert</u>	<u>RIA nicht extrahiert</u>	
	100 µl	100 µl 1:100	50 µl 1:10
	µg/dl	µg/dl	µg/dl
1	363	370	367
2	350	472	417
3	415	435	440
4	378	411	402
5	380	465	420
6	435	420	380
7	380	392	410
8	410	387	395
9	394	389	401
10	426	460	448
11	445	422	411
12	448	445	450
13	335	415	420
14	435	405	384
15	459	387	417
16	368	358	382
17	390	395	377
18	385	428	411
19	411	417	433
20	375	395	405
21	420	398	380
22		407	415
23		401	420
$\bar{x}$ =	400 µg/dl	412 µg/dl	408 µg/dl
SD =	34,0 µg/dl	29,1 µg/dl	22,8 µg/dl
VK =	8,5%	7,1%	5,6%

3. Ergebnisse

3.1. Der RIA mit Extraktion verglichen mit dem RIA ohne Extraktion

Erwartungsgemäß unterschieden sich die Ergebnisse der Urincortisol-Analysen in Abhängigkeit von der Proben-vorbereitung erheblich.

Die Ausscheidung an freiem Urincortisol variierte bei den gesunden Probanden von 23,0 bis 115 µg/die im RIA mit Extraktion und von 74,0 bis 404 µg/die im RIA ohne Extraktion; bei Adipösen im RIA mit Extraktion von 69,0 bis 177 µg/die, im RIA ohne Extraktion von 197 bis 593 µg/die; bei den Cushing-Patienten von 107 bis 434 µg/die im RIA mit Extraktion und von 432 bis 975 µg/die im RIA ohne Extraktion; bei den hospitalisierten Kindern und Jugendlichen von 7,00 bis 390 µg/die im RIA mit Extraktion und von 27,0 bis 508 µg/die im RIA ohne Extraktion.

Abbildung 6 zeigt den Zusammenhang zwischen den Ergebnissen des RIAs mit Extraktion und des RIAs ohne Extraktion bei gesunden Probanden. Die Ergebnisse des RIAs mit Extraktion waren eng mit den Ergebnissen des RIAs ohne Extraktion korreliert ($r=0,86$; $n=31$). Im Mittel lagen die Ergebnisse des RIAs ohne Extraktion 4,1 mal höher als die des RIAs ohne Extraktion.

In Abbildung 7 ist der Quotient $n.\text{extr.Cortisol}/\text{extr.Cortisol}$ (2,6-5,7) für beide Geschlechter abhängig von den Lebensjahren dargestellt. Für Mädchen lag der Quotient zwischen 2,6 und 4,7 (Mittelwert $\pm$ 1 Standardabweichung: $3,52 \pm 0,66$; $n=12$) für Knaben zwischen 2,8 und 5,7 (Mittelwert $\pm$ 1 Standardabweichung: $4,11 \pm 0,83$; $n=19$). Im T-Test erwies sich dieser Geschlechtsunterschied bei den gesunden Probanden als signifikant ($p<0,05$). Die Ursache hierfür blieb unklar.

Der Quotient blieb bei gesunden Kindern mit zunehmendem Alter konstant ($p>0,05$). Die Annahme, daß von der

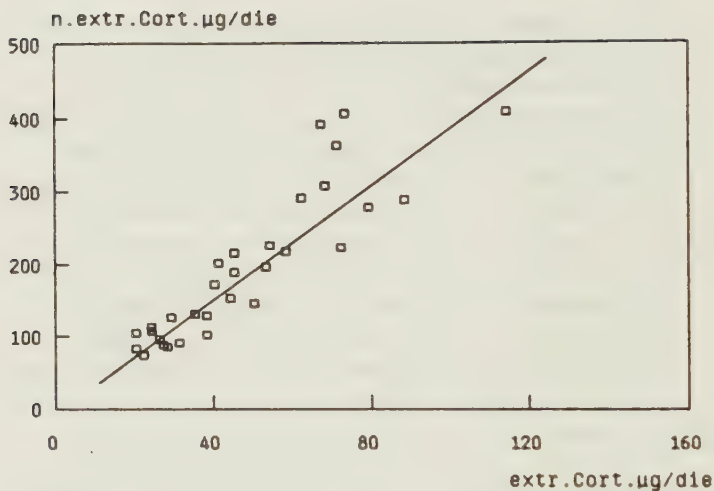


Abb. 6:

Vergleich der täglichen Cortisolausscheidung zwischen dem RIA mit Extraktion und dem RIA ohne Extraktion. Dargestellt ist das Normalkollektiv ($r=0,86$; $n=31$).

Abkürzungen:

extr. Cort.µg/die = Tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol im RIA mit Extraktion.

n.extr.Cort.µg/die = Tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol im RIA ohne Extraktion.

QUOTIENT:

$n.\text{extr.Cort.}/\text{extr.Cort.}$

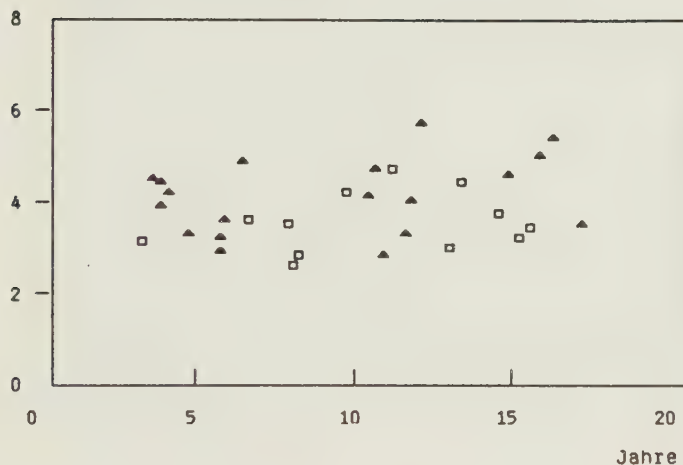


Abb. 7:

Quotient zwischen der täglichen Ausscheidung an freiem Urincortisol im RIA mit Extraktion und im RIA ohne Extraktion im Normalkollektiv. Mit $p > 0,05$ leicht signifikanter Geschlechtsunterschied zwischen Mädchen und Knaben, mit leicht höheren Werten bei Knaben.

□ = weiblich n=12

▲ = männlich n=19

QUOTIENT:
 $n.\text{extr.Cort.}/\text{extr.Cort.}$

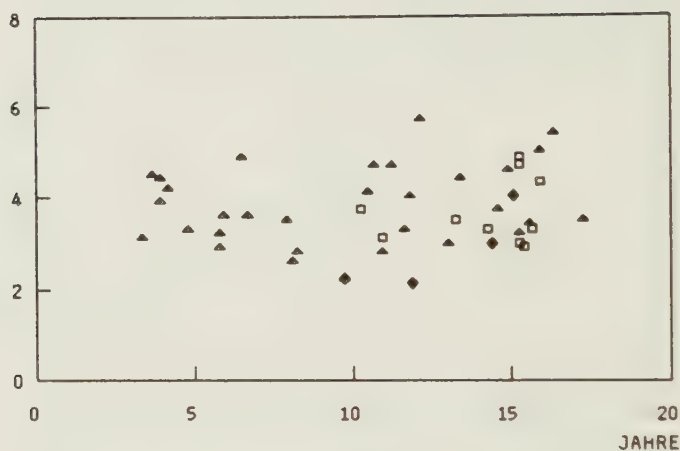


Abb. 8:

Quotient zwischen der täglichen Ausscheidung an freiem Urincortisol
 im RIA ohne Extraktion und im RIA mit Extraktion im Lauf des
 Wachstums.

- | | | |
|---|---------------------|------|
| ▲ | - Normalkollektiv | n=31 |
| □ | - Adipöse | n=10 |
| ◆ | - Cushing-Patienten | n=4 |

Adrenarche oder der Pubertät an Abbauprodukte von anderen NNR-Steroiden oder von gonadalen Steroiden im RIA ohne Extraktion vermehrt mitgemessen werden könnten, bestätigte sich nicht.

Bei den Adipösen lag der Quotient zwischen 2,2 und 4,9 (Mittelwert $\pm$ 1 Standardabweichung: $3,7 \pm 0,7$; $n=10$); bei den Cushing-Patienten zwischen 2,9 und 4 mit einer Tendenz zu eher niedrigen Werten; bei den hospitalisierten Kindern zwischen 2,0 und 5,0 (Abb. 8).

Die Theorie, daß bei Cushing-Patienten Abbauprodukte der Corticosteroide, gerade bei einem Assay ohne Extraktion, stark ins Gewicht fallen würden und so zu überproportional hohen Werten führen würden, bestätigte sich für unseren Versuchsansatz nicht. Andererseits könnten u. U., da auch der Assay mit Extraktion nicht ganz spezifisch war, die beim Cushing postulierten interferierenden steroidalen Substanzen schon im Assay mit Extraktion mitgemessen worden sein. Die zwei Cushing-Patienten mit der höchsten täglichen Ausscheidung an freiem Cortisol zeigten sogar auffallend niedrige Quotienten. Zu erklären ist dieser Befund mit dem Schwellenphänomen, siehe unter 1.2.1..

3.2. Altersabhängigkeit der täglichen Ausscheidung an freiem Urincortisol

Wenn man die tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol unabhängig von Variablen wie Alter, Körpergewicht, Körperoberfläche und täglicher Kreatininausscheidung betrachtete, so ergaben sich beträchtliche Überschneidungen zwischen Gesunden und Kranken.

Im untersuchten Normalkollektiv stieg das Körpergewicht vom jüngsten untersuchten Kind mit 16 kg um 400 % auf 81 kg beim ältesten Probanden, die Körperoberfläche nahm um 200 % zu, die tägliche Kreatininausscheidung um 500 %; analog nahm die freie Cortisolausscheidung um

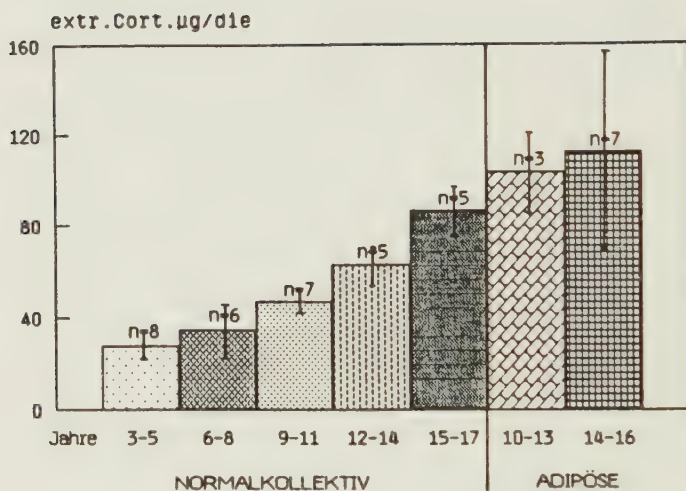


Abb. 9:

Tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol im RIA mit Extraktion abhängig vom Alter. Dargestellt sind die Mittelwerte ± 1 Standardabweichung der einzelnen Altersgruppen des Normalkollektivs und der Adipösen.

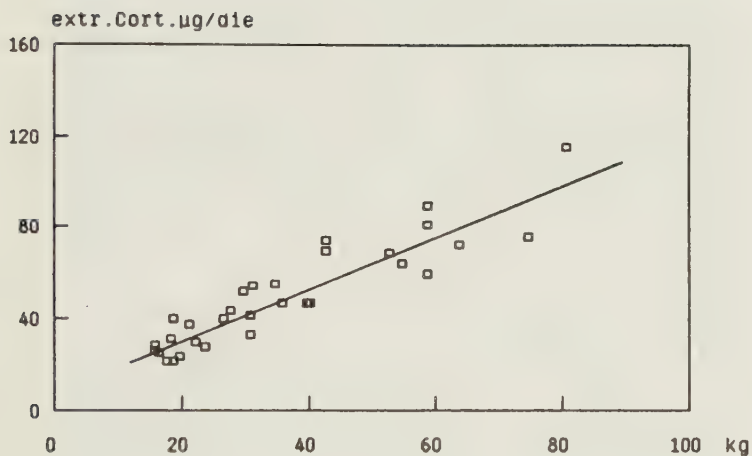


Abb. 10

Tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol im RIA mit Extraktion
abhängig vom Körpergewicht. Dargestellt ist das Normalkollektiv
($r=0,92$; $n=31$).

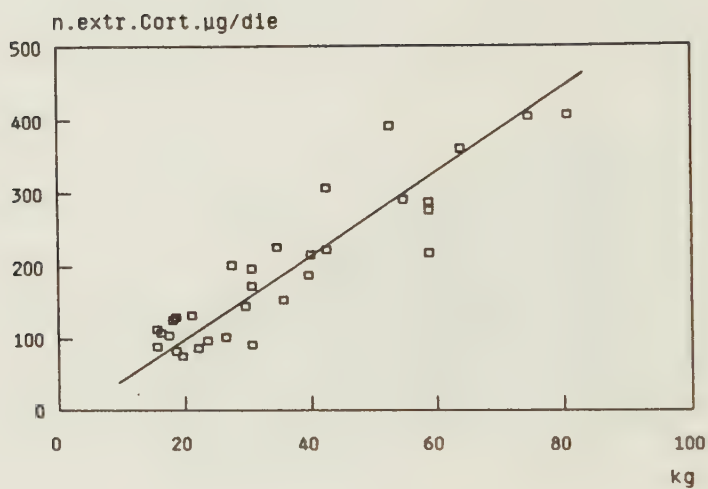


Abb. 11:

Tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol im RIA ohne Extraktion
abhängig vom Körpergewicht. Dargestellt ist das Normalkollektiv
($r=0,87$; $n=31$).

über 300 % zu.

Abbildung 9 zeigt die absolute Ausscheidung an freiem Urincortisol im Normalkollektiv und in der Gruppe der adipösen Kinder, klassifiziert nach Altersgruppen.

Das freie Urincortisol stieg zwar im Laufe des Wachstums an, war aber nicht, wie man am Vergleich Adipöser mit Gesunden sieht, allein mit dem Lebensalter korreliert, sondern in stärkerem Maße auch mit dem Körpergewicht. Adipöse zeigten eine weit höhere Urincortisolausscheidung als gleichaltrige normalgewichtige Kinder. Eine Beurteilung aufgrund der altersabhängigen Normalwerte ermöglichte es nicht, im Einzelfall eine Entscheidung zu treffen, ob der gemessene Wert pathologisch war.

3.3. Abhängigkeit der Ausscheidung an freiem Urincortisol vom Körpergewicht

Die Abbildungen 10 und 11 zeigen, daß die tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol sowohl im RIA mit ($r=0,92$; $n=31$) als auch im RIA ohne Extraktion ($r=0,87$; $n=31$) eng mit dem Körpergewicht korreliert war. Ein Geschlechtsunterschied existierte nicht ($p>0,05$). Die Ausscheidung an freiem Urincortisol bezogen auf kg Körpergewicht änderte sich im RIA mit Extraktion und im RIA ohne Extraktion im Laufe des Wachstums nicht ($p>0,05$; beim Vergleich der 3-9jährigen mit den 10-17jährigen). Auch hier ergab sich kein Hinweis auf eine Zunahme der interferierenden Substanzen ab der Pubertät. Möglicherweise spielte auch eine Rolle, daß die Gewichtskurve ab 8-10 Jahren steiler wird und so eine erhöhte Ausscheidung an freiem Urincortisol durch das steigende Körpergewicht ausgeglichen wird.

Die Abbildungen 12 und 13 zeigen, daß die tägliche Cortisolausscheidung, bezogen auf das Körpergewicht, unabhängig vom Alter war.

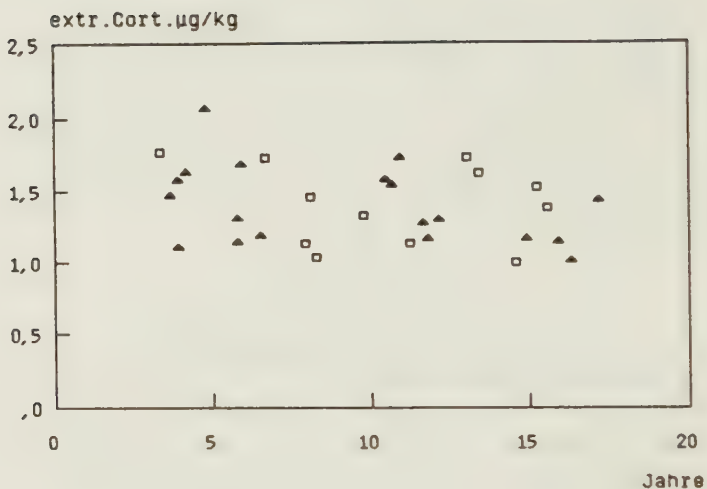


Abb. 12:

Altersabhängige Ausscheidung an freiem Urincortisol Im 24-Stunden-
urin bezogen auf das Körpergewicht ($\mu\text{g/kg}$) im RIA mit Extraktion
getrennt nach Geschlechtern.

□ - weiblich n=12

▲ - männlich n=19

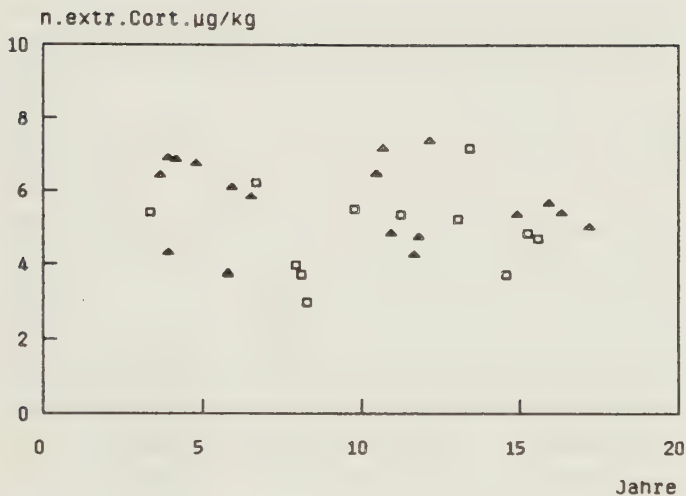


Abb. 13:

Altersabhängige Ausscheidung an freiem Urincortisol im 24-Stundenurin bezogen auf das Körpergewicht ($\mu\text{g/kg}$) im RIA ohne Extraktion getrennt nach Geschlechtern.

- = weiblich n=12
 ▲ = männlich n=19

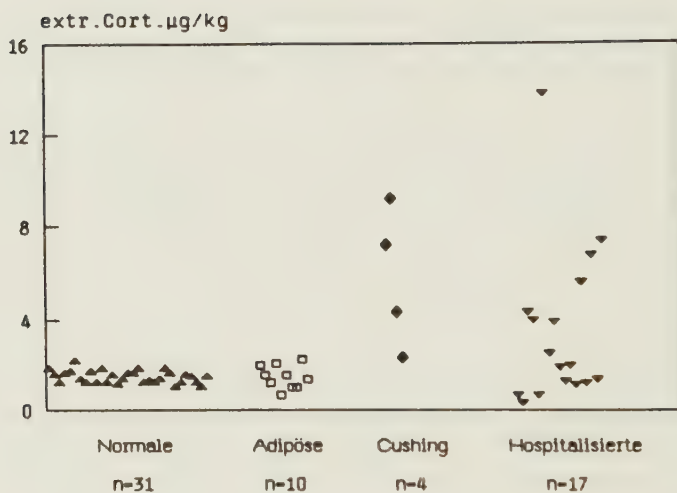


Abb. 14:

Tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol im RIA mit Extraktion bezogen auf das Körpergewicht ($\mu\text{g/kg}$). Dargestellt sind das Normal-kollektiv, die Adipösen, die Cushing-Patienten und die hospitalisierten Kinder.

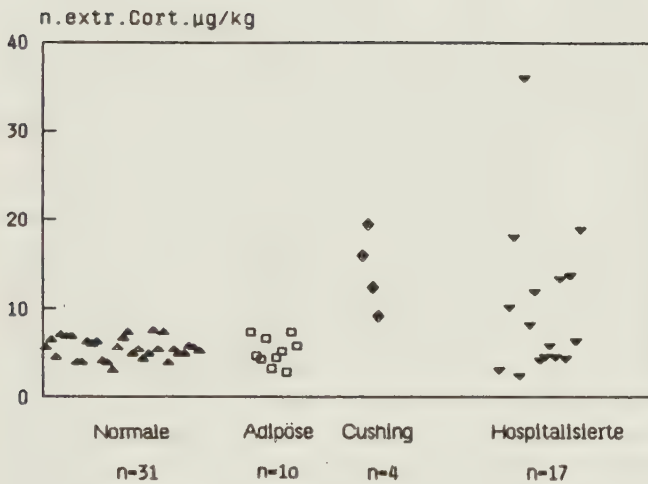


Abb. 15:

Tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol im RIA ohne Extraktion bezogen auf das Körpergewicht ($\mu\text{g/Kg}$). Dargestellt sind das Normal - kollektiv, die Adipösen, die Cushing-Patienten und die hospitalisierten Kinder.

Sie betrug $1,39 \pm 0,27 \mu\text{g/kg}$ (Mittelwert ± 1 Standardabweichung) nach Extraktion; ohne Extraktion $5,30 \pm 1,20 \mu\text{g/kg}$ (Mittelwert ± 1 Standardabweichung). Ein statistisch signifikanter Geschlechtsunterschied existierte nicht. Allerdings zeigte sich im RIA mit Extraktion bei Knaben >12 Jahre eine Tendenz zu niedrigeren Werten, was möglicherweise mit dem stärkeren Anstieg der Muskelmasse gegenüber den Mädchen erklärt werden könnte. Im RIA ohne Extraktion ließ sich dieser Unterschied, bedingt durch den statistisch signifikant höheren Quotienten $n.\text{extr. Cortisol}/\text{extr. Cortisol}$ der Knaben nicht mehr nachweisen.

Bei den Adipösen variierte die Höhe des freien Urincortisols, bezogen auf das Körpergewicht, im RIA mit Extraktion zwischen normal niedrig bis leicht erhöht (Abb. 14). Das freie Urincortisol, bezogen auf das Körpergewicht, betrug bei den Adipösen $1,40 \pm 0,49 \mu\text{g/kg}$ (Mittelwert ± 1 Standardabweichung). Im RIA ohne Extraktion (Abb. 15) unterschieden sich die Adipösen nicht vom Normalkollektiv (Mittelwert ± 1 Standardabweichung: $5,02 \pm 1,57 \mu\text{g/kg}$). Alle Cushing-Kranken lagen in beiden Assays, mit $2,22$ bis $9,16 \mu\text{g/kg}$ im RIA mit Extraktion (Abb. 14) und $8,99$ bis $19,4 \mu\text{g/kg}$ im RIA ohne Extraktion (Abb. 15), außerhalb des Normalbereichs. Die hospitalisierten Kinder streuten mit Werten zwischen $1,56$ und $35,8 \mu\text{g/kg}$ im RIA mit Extraktion (Abb. 14) und $17,6$ und $709 \mu\text{g/kg}$ im RIA ohne Extraktion (Abb. 15) vom normalen bis weit in den pathologischen Bereich, was sicherlich auf die unterschiedlichen Stress-Situationen zurückzuführen ist.

Der RIA ohne Extraktion hatte bei dieser Darstellungsweise den Vorteil, daß überhaupt kein Unterschied zwischen dem Normalkollektiv und den Adipösen festzustellen war; zusätzlich erlaubte diese Darstellungsweise, (freies Urincortisol im RIA ohne Extraktion $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht), eine Diskriminierung des grenzwertig Cushing-Kranken (klinisch milder Verlauf) von dem Normalkollektiv und den Adipösen.

3.4. Freies Urincortisol bezogen auf die Körperoberfläche

Die tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol war eng mit der Körperoberfläche korreliert. Diese Aussage hatte sowohl für den RIA mit Extraktion mit $r=0,91$ (Abb. 16) als auch für den RIA ohne Extraktion mit $r=0,92$ (Abb. 17) Gültigkeit.

Bezog man die tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol, bezogen auf die Körperoberfläche ($\mu\text{g}/\text{m}^2$), auf die Lebensjahre (Abb. 18 und 19), so zeichnete sich eine Tendenz zu höheren Werten in der Altersgruppe über 10 Jahren ab. Der Mittelwert ± 1 Standardabweichung lag für die Altersgruppe <10 Jahre im RIA mit Extraktion bei $36,1 \pm 7,39 \mu\text{g}/\text{m}^2$; für die Altersgruppe >10 Jahre bei $43,4 \pm 7,17 \mu\text{g}/\text{m}^2$ (Abb. 18). Noch deutlicher wurde diese Tendenz im RIA ohne Extraktion. Der Mittelwert ± 1 Standardabweichung der Gruppe <10 Jahre lag bei $131 \pm 32,5 \mu\text{g}/\text{m}^2$; für die Gruppe >10 Jahre bei $176 \pm 34,4 \mu\text{g}/\text{m}^2$ (Abb. 19). Im T-Test war dieser Unterschied sowohl im RIA mit Extraktion mit $p<0,05$ als auch im RIA ohne Extraktion mit $p<0,01$ signifikant. Ein Geschlechtsunterschied war nicht festzustellen. Als Erklärung dafür bot sich an, daß die Körperoberfläche im Laufe des Wachstums linear zunimmt, wohingegen die Körpergewichtskurve vom Beginn der Pubertät an steiler ansteigt. In die übliche Berechnung der Körperoberfläche gehen die Unterschiede der Proportionen von kleinen Kindern und Jugendlichen nicht ein, ebensowenig die unterschiedliche Fett-/Muskelverteilung.

In den vorliegenden Untersuchungen stieg das freie Urincortisol/ m^2 im Laufe des Wachstums leicht an. Bei den Adipösen war das Verhalten des freien

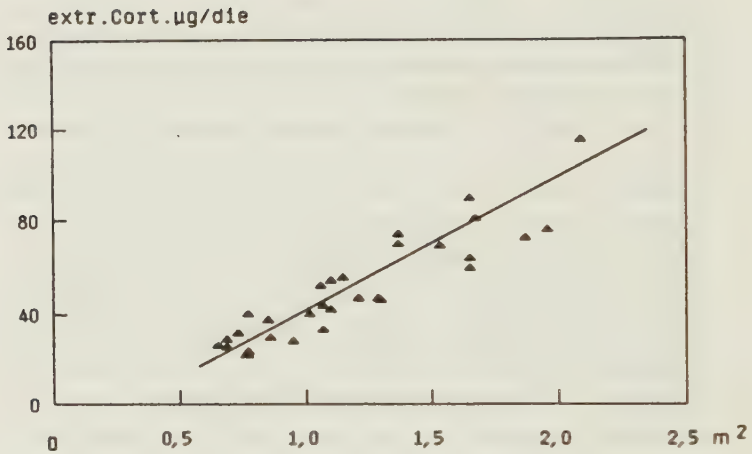


Abb. 16:

Tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol im RIA mit Extraktion abhängig von der Körperoberfläche ($\mu\text{g}/\text{m}^2$). Dargestellt ist das Normalkollektiv ($r=0,92$, $n=31$).

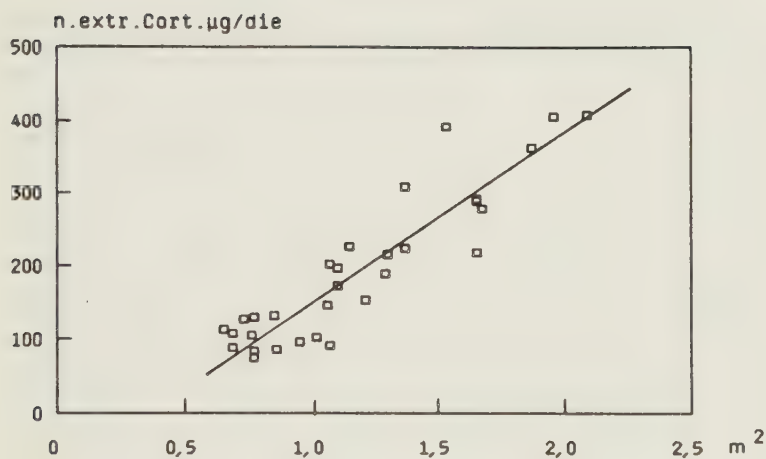


Abb. 17:

Tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol im RIA ohne Extraktion abhängig von der Körperoberfläche (m²). Dargestellt ist das Normalkollektiv ($r=0,91$; $n=31$).

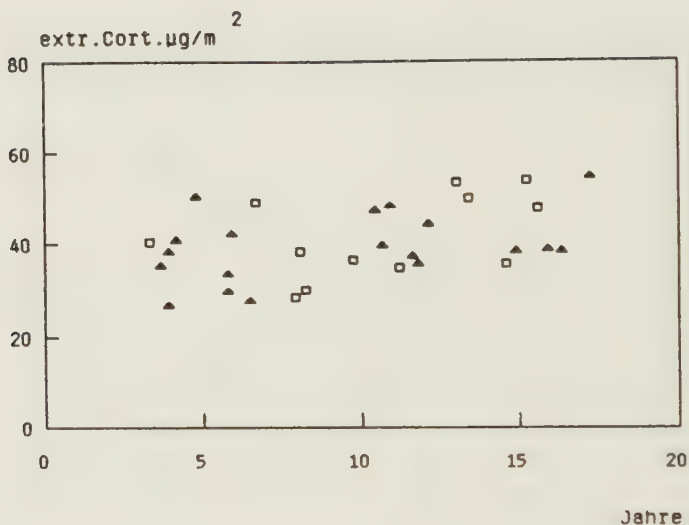


Abb. 18:

Tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol im RIA mit Extraktion bezogen auf die Körperoberfläche ($\mu\text{g}/\text{m}^2$). Dargestellt sind die Mittelwerte und eine Standardabweichung der Altersgruppen <10 Jahre und >10 Jahre. Der Unterschied ist statistisch signifikant ($p < 0,05$).

□	= weiblich	n=12
▲	= männlich	n=19

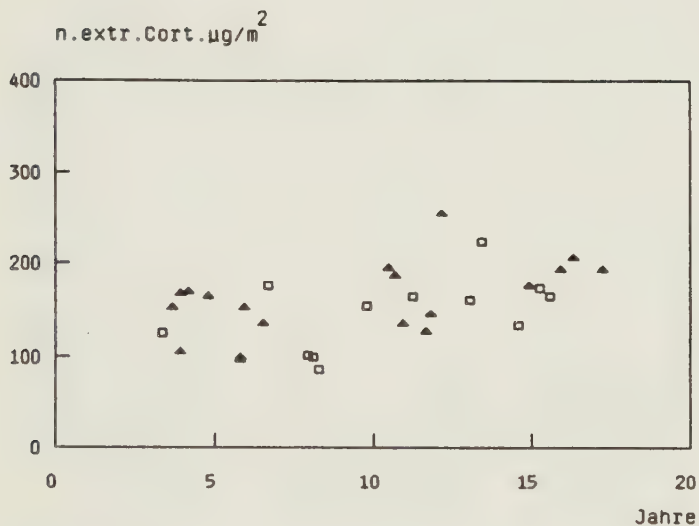


Abb. 19:

Tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol im RIA ohne Extraktion bezogen auf die Körperoberfläche ($\mu\text{g}/\text{m}^2$). Dargestellt sind die Mittelwerte und eine Standardabweichung der Altersgruppen <10 Jahre und >10 Jahre. Der Unterschied ist statistisch signifikant ($p < 0,01$).

□ = weiblich n=12

▲ = männlich n=19

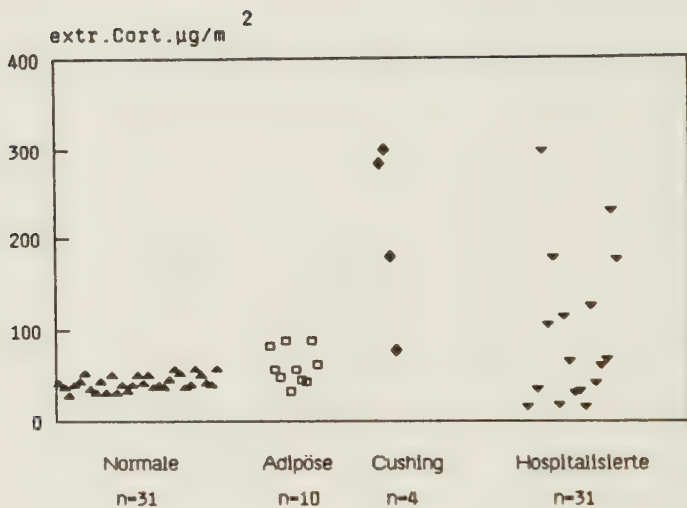


Abb. 20:

Tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol im RIA mit Extraktion bezogen auf die Körperoberfläche ($\mu\text{g}/\text{m}^2$). Dargestellt sind das Normal-kollektiv, die Adipösen, die Cushing-Patienten und die hospitalisierten Kinder.

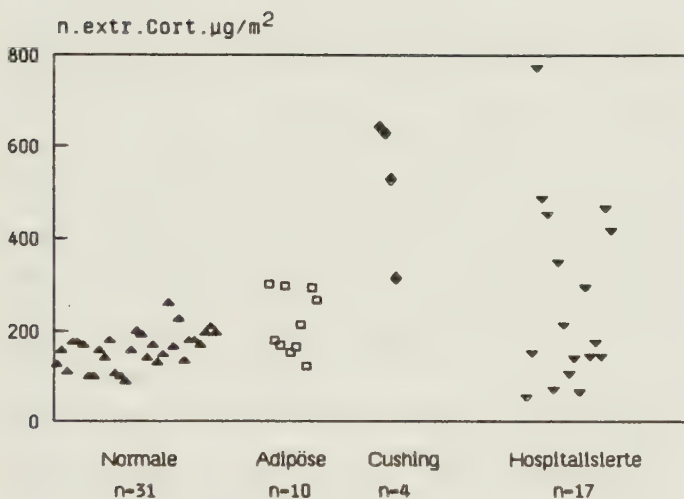


Abb. 21:

Tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol im RIA ohne Extraktion bezogen auf die Körperoberfläche (m^2). Dargestellt sind das Normalkollektiv, die Adipösen, die Cushing-Patienten und die hospitalisierten Patienten. Die Verteilung von links nach rechts innerhalb jeder Gruppe entspricht ihrer Altersverteilung.

Urin-cortisols bezogen auf die Körperoberfläche uneinheitlich (Mittelwert $\pm$ 1 Standardabweichung: $58,8 \pm 20,1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ im RIA mit Extraktion und $211 \pm 68,4 \mu\text{g}/\text{m}^2$ im RIA ohne Extraktion). Ein Teil der Adipösen lag mit der täglichen Ausscheidung an freiem Urin-cortisol bezogen auf die Körperoberfläche im Normalbereich, ein anderer Teil lag leicht höher als das Normalkollektiv (Abb. 20). Noch deutlicher wurde dieses unterschiedliche Verhalten im RIA ohne Extraktion (Abb. 21). Die beiden Gruppen der Adipösen unterschieden sich weder in ihrer Alters- und Geschlechtszusammensetzung noch im Ausmaß des Übergewichts. Die Patienten mit Cushing-Syndrom ($76,8 - 297 \mu\text{g}/\text{m}^2$ im RIA mit Extraktion (Abb. 20) und $311 - 637 \mu\text{g}/\text{m}^2$ im RIA ohne Extraktion (Abb. 21)), mit Ausnahme des mild verlaufenden Morbus Cushing, grenzten sich von den Normalwerten und den Werten bei Adipösen ab. Die hospitalisierten Probanden zeigten wiederum eine stress-bedingte weite Streuung ($12,1 - 296 \mu\text{g}/\text{m}^2$ im RIA mit Extraktion (Abb. 20) und $49,3 - 770 \mu\text{g}/\text{m}^2$ im RIA ohne Extraktion (Abb. 21)).

Die Darstellung der täglichen Cortisolausscheidung, bezogen auf die Körperoberfläche, ergab keine so klare Aussage wie die Darstellung des Cortisols bezogen auf das Körpergewicht.

3.5. Das freie Urin-cortisol bezogen auf die tägliche Kreatininausscheidung

Die tägliche Ausscheidung an Kreatinin, bezogen auf das Körpergewicht, lag in der Normalgruppe für Kleinkinder zwischen $12,3$ und $20,3 \text{ mg}/\text{kg}$ (Mittelwert $\pm$ 1 Standardabweichung: $15,3 \pm 2,7 \text{ mg}/\text{kg}$; $n=8$). Für Kinder von 6 bis 11 Jahren zwischen $11,5$ und $27,1 \text{ mg}/\text{kg}$ (Mittelwert $\pm$ 1 Standardabweichung: $16,7 \pm 4,3 \text{ mg}/\text{kg}$; $n=13$). Für Mädchen von 12 bis 17 Jahren lag die tägliche

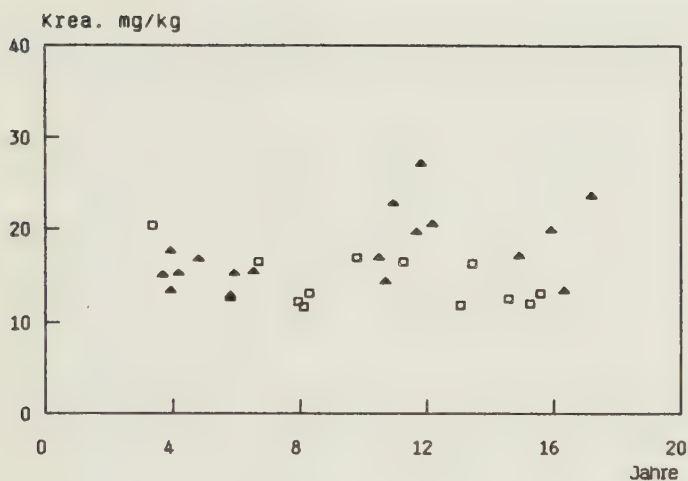


Abb. 22:

Tägliche Ausscheidung an Kreatinin bezogen auf das Körpergewicht
($\mu\text{g/kg}$) im Lauf des Wachstums, getrennt nach Geschlechtern.

□ = weiblich n=12

▲ = männlich n=19

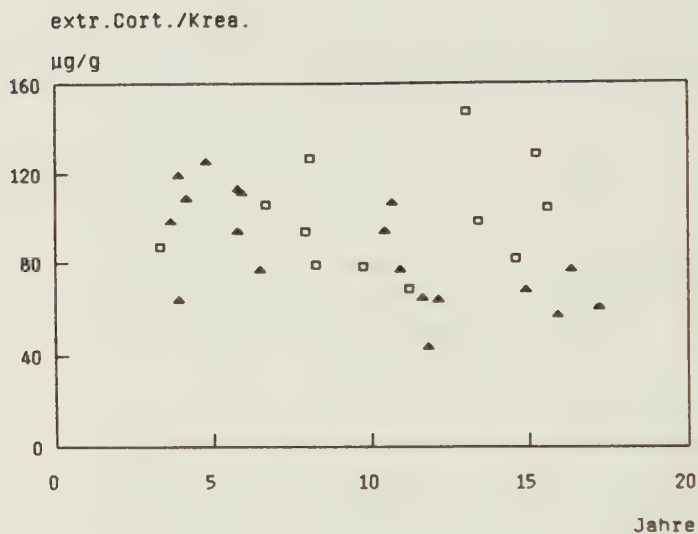


Abb. 23:

Tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol im RIA mit Extraktion
bezogen auf die Ausscheidung an Kreatinin ($\mu\text{g/g}$) im Lauf des
Wachstums.

- = weiblich n=12
 ▲ = männlich n=19

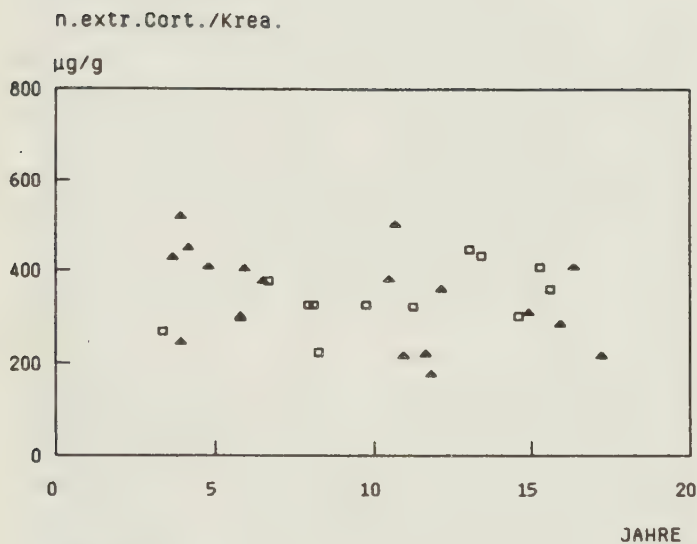


Abb. 24:

Tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol im RIA ohne Extraktion
 bezogen auf die Ausscheidung von Kreatinin ($\mu\text{g/g}$) im Lauf des
 Wachstums.

□ = weiblich n=12

▲ = männlich n=19

Kreatininausscheidung, bezogen auf das Körpergewicht, zwischen 11,6 und 16,1 mg/kg (Mittelwert $\pm$ 1 Standardabweichung: $13,0 \pm 1,8$ mg/kg; n=5); für Knaben von 12 bis 17 Jahren zwischen 13,2 und 23,6 mg/kg (Mittelwert $\pm$ 1 Standardabweichung: $18,8 \pm 3,9$ mg/kg; n=5). Die Werte entsprachen den für das Labor gültigen Normwerten der Messung von Kreatinin mit der Methode nach Jaffé (Bidlinauer und Witt 1977).

Abbildung 22 zeigt die tägliche Kreatininausscheidung, bezogen auf das Körpergewicht, getrennt nach Geschlechtern im Laufe des Wachstums.

Die tägliche Cortisolausscheidung, bezogen auf Kreatinin, lag im RIA mit Extraktion für Mädchen zwischen 68,2 und 147 μ g/g Kreatinin (Mittelwert $\pm$ 1 Standardabweichung: $99,3 \pm 23,8$ μ g/g; n=12) für Knaben zwischen 60,0 und 124 μ g/g Kreatinin (Mittelwert $\pm$ 1 Standardabweichung: $84,5 \pm 24,2$ μ g/g; n=19) (Abb. 23). Der Geschlechtsunterschied war statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$). Ab 12 Jahren lag die tägliche Cortisolausscheidung bezogen auf das Kreatinin für Mädchen leicht höher als für Knaben. Zu erklären war dieses Phänomen mit dem proportional stärkeren Anstieg der täglichen Kreatininausscheidung bei Knaben ab 12 Jahren, bedingt durch die größere Muskelmasse (Clark et al. 1951).

Im RIA ohne Extraktion lag die tägliche Cortisolausscheidung, bezogen auf Kreatinin, für Mädchen zwischen 222 und 444 μ g/g Kreatinin (Mittelwert $\pm$ 1 Standardabweichung: $342 \pm 66,2$ μ g/g; n=12) für Knaben zwischen 211 und 450 μ g/g Kreatinin (Mittelwert $\pm$ 1 Standardabweichung: 340 ± 102 μ g/g; n=19) (Abb. 24). Im Gegensatz zum RIA mit Extraktion war hier kein Geschlechtsunterschied festzustellen. Ursache dafür war der niedrigere Quotient $n_{extr.Cortisol} / extr.Cortisol$ der 5 ältesten Mädchen gegenüber dem Quotienten bei den 5 ältesten Knaben.

Adipöse Patienten (Bereich: 46,7-86,8 μ g/g, Mittelwert

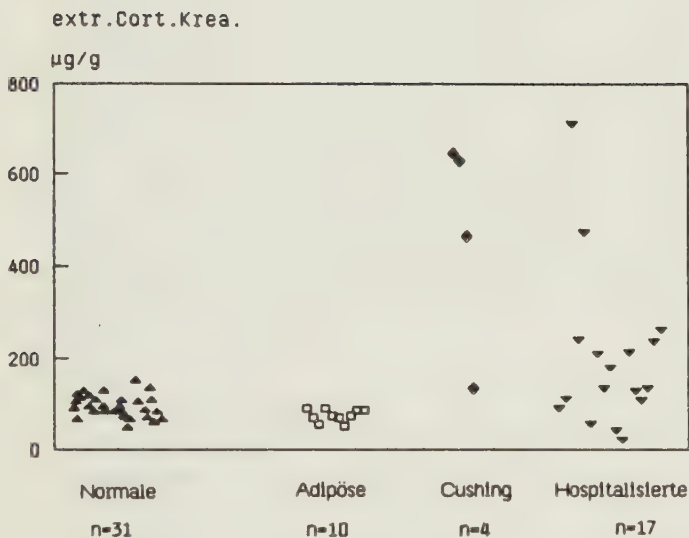


Abb. 25:

Tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol bezogen auf die tägliche Kreatininausscheidung ($\mu\text{g/g}$). Dargestellt sind das Normalkollektiv, die Adipösen, die Cushing-Patienten und die hospitalisierten Patienten.

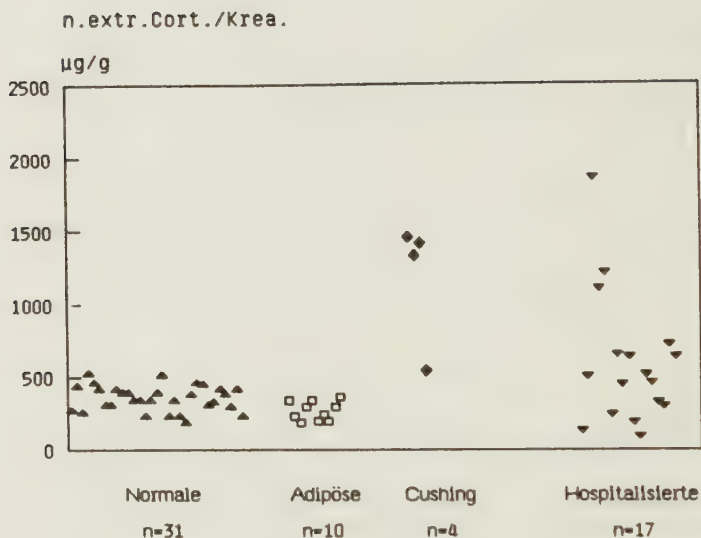


Abb. 26:

Tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol im RIA ohne Extraktion bezogen auf die tägliche Kreatininausscheidung ($\mu\text{g/g}$). Dargestellt sind das Normalkollektiv, die Adipösen, die Cushing-Patienten und die hospitalisierten Patienten.

± 1 Standardabweichung: $70,7 \pm 14,0 \mu\text{g/g}$, im RIA mit Extraktion; Bereich: $183\text{--}353 \mu\text{g/g}$, Mittelwert ± 1 Standardabweichung: $258 \pm 63,2 \mu\text{g/g}$ im RIA ohne Extraktion) unterschieden sich in der täglichen Ausscheidung an freiem Urincortisol, bezogen auf die Kreatininausscheidung, nicht von den gesunden Probanden (Abb. 25 und 26). Die Cushing-Patienten lagen mit Ausnahme des klinisch mild verlaufenden Cushing-Syndroms weit außerhalb der Normalwerte ($132\text{--}645 \mu\text{g/g}$ im RIA mit Extraktion und $533\text{--}1449 \mu\text{g/g}$ im RIA ohne Extraktion), (Abb. 25 und Abb. 26). Die hospitalisierten Kinder streuten wie schon bei den anderen Darstellungsweisen vom normalen bis weit in den pathologischen Bereich ($18,0\text{--}709 \mu\text{g/g}$ im RIA mit Extraktion; $88,0\text{--}1846 \mu\text{g/g}$ im RIA ohne Extraktion), (Abb. 25 und Abb. 26).

3.6. Bestimmung des freien Urincortisols im Morgenurin und in einzelnen Urinportionen über den Tag verteilt

Bei 19 Kindern wurde der Urin portioniert gesammelt und das freie Urincortisol in jeder Urinportion einzeln bestimmt. Die Sammelperioden konnten zeitlich nicht standardisiert werden. Die Anzahl der Urinportionen pro Proband variierte zwischen 4 und 9 Portionen.

Bei 15 Probanden wurde im Morgenurin bis 9 Uhr die größte Menge an freiem Urincortisol gefunden. 3 Probanden zeigten die größte Urincortisolausscheidung im Laufe des Vormittags bis ca. 13 Uhr. Ein Proband hatte die höchste Ausscheidung an freiem Urincortisol am Nachmittag.

Bei allen Probanden war deutlich, daß eine proportional große Menge an freiem Urincortisol verglichen mit den niedrigen Cortisolplasmaspiegeln im Laufe des Vormittags bis in die späten Mittagsstunden ausgeschieden wurde. Die absoluten Werte ließen sich nicht

vergleichen, da die Portionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten gesammelt wurden.

Bezog man die Cortisolausscheidung im Morgenurin auf die gleichzeitig ausgeschiedene Kreatininmenge, dann lagen die Werte an freiem Urincortisol/Kreatinin bei 12 Probanden in dem für den 24-Stundenurin angegebenen Bereich, bei 3 Probanden um 11 - 39 % über den angegebenen Höchstwerten, bei 4 Probanden 10 - 19 % zu niedrig.

Verglich man bei den einzelnen Probanden das freie Urincortisol/Kreatinin am Morgen mit dem freien Urincortisol/Kreatinin über 24-Stunden so ergaben sich intraindividuelle Abweichungen von -50 % bis +35 %.

Verglich man den Cortisol-Kreatinin-Quotienten einer beliebigen, im Lauf des Tages gewonnenen Urinportion mit dem Cortisol-Kreatinin-Quotienten des 24-Stundenurins, so konnte wegen noch stärkerer Variationen überhaupt keine Aussage getroffen werden.

Aus diesen Untersuchungen ergab sich, daß weder der Morgenurin noch eine beliebige Urinportion einen 24-Stunden-Urin bei der Bestimmung des freien Urincortisols ersetzen kann.

4. Diskussion

4.1. Normalwerte in der Literatur

Immer wieder wurden von verschiedenen Untersuchern Normalwerte für das freie Urincortisol aufgestellt. Die Bestimmungen unterschieden sich sowohl hinsichtlich der Methode (RIA, PBA, u. a.) als auch der Spezifität, die von der Güte des Antikörpers, der jeweiligen Vorreinigung und Trennmethode der einzelnen Steroide (Extraktion mit Kohlenwasserstoffen, chromatographische Vorreinigung) abhängt. Die Ergebnisse konnten wegen der unterschiedlichen Methoden kaum miteinander verglichen werden. Sehr spezifische Methoden (multiple Vorreinigungen, Gaschromatographie) sind für den Routinebetrieb wegen des erheblichen technischen und finanziellen Aufwandes kaum zu empfehlen. Sie scheinen außerdem keine diagnostischen Vorteile zu bringen.

Tabelle 7 zeigt die in der Literatur gefundenen Ergebnisse der Messung des freien Urincortisols mit verschiedenen Methoden bei Kindern und Erwachsenen. Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung im Normalkollektiv. Unter den wenigen Untersuchungen des freien Urincortisols bei Kindern war nur eine einzige radioimmunologische Untersuchung, allerdings ohne Angaben, ob die Patienten hospitalisiert waren, ohne Angaben über Geschlechtsunterschiede und ohne systematische Überprüfung, auf welche Parameter das freie Urincortisol bezogen werden könnte.

Die Übersicht der in der Literatur gefundenen Werte macht noch einmal deutlich, daß jede Methode zu unterschiedlichen Ergebnissen führt und Routinemethoden sicher nicht nur das freie Urincortisol messen, sondern neben unspezifischen Substanzen auch Steroidmetaboliten mit teilweise noch unbekannter Struktur. Genauer wäre es statt vom freien Urincortisol von den

freien Urincorticoiden zu sprechen (Köbberling und v. z.
Mühlen 1972, Murphy et al. 1981).

Tabelle 7, Teil 1: Normalwerte für freies Urincortisol bei Kindern und Erwachsenen
 Angegeben sind entweder der Mittelwert, der Mittelwert $\pm$ 1 Standard-
 abweichung, oder der Bereich.

Untersucher	Methode	Anzahl	W.	m.	Alter	freies Urincortisol	
						$\mu\text{g}/24$ Stunden	$\mu\text{g}/\text{g}$ Kreatinin $\mu\text{g}/\text{m}^2$
Stoelcke (1970) Franks (1973)	o + Fluorometrie	38			4-9M.	3,52-17,48	74 $\pm$ 18 72 $\pm$ 17 68 $\pm$ 15
	o PBA	30			5-9J. 10-12J. Erw.		
Stoelcke (1973) Murphy et al. (1981)	o + Fluorometrie	11			4M.-12J.	96 $\pm$ 35	37 $\pm$ 9 44 $\pm$ 16 54 $\pm$ 14 27.3
	o * PBA	79			2-12J.		
	o PBA	6			2-12J.		
	o * PBA	6		6	Erw.		
	o PBA	6		6	Erw.		
	o * PBA	6			Erw.		
	o PBA	6	6		Erw.		
	o * PBA	6	6		Erw.		
Sonino et al. (1981) Canalis et al. (1982)	* RIA	18			3,5-18J.	13,0 $\pm$ 5,6 15,2 $\pm$ 6,3 19,6 $\pm$ 8,6 20,8 $\pm$ 6,0 9,98 $\pm$ 3,2 33,3 $\pm$ 3,1 14,8 $\pm$ 3,6 40,9 $\pm$ 23,0	19.03 $\pm$ 14.0 13,5 $\pm$ 7,7 15,3 $\pm$ 7,3 12,0 $\pm$ 5,0 10,6 $\pm$ 3,2
	o Fl.	29	15		4-15J.		
		45	26	14	Erw.		
		28	8	19	Erw.		
Nakamura und Yakata (1984)	HPLC	28	7		5-10J. 14-19J.	28,5 $\pm$ 7,7 25,6 $\pm$ 14,5	
		34	6	7	14-19J. Erw.		
Burke und Beard- well (1972)	o PBA	34			Erw.	38	
Ruder et al. (1972)	o + RIA	8			Erw.	43	
Ratcliff und Hall (1973)	o RIA	8			Erw.	80	
	o Fluorometrie	x	x	x	Erw.	70 -180 90 -264	

Tabelle 7, Teil 2: Normalwerte für freies Urincortisol bei Kindern und Erwachsenen
 Angegeben sind entweder der Mittelwert, der Mittelwert $\pm$ 1 Standard-
 abweichung, oder der Bereich.

Untersucher	Methode	Anzahl	w.	m.	Alter	freies Urincortisol	
						$\mu\text{g}/24$ Stunden	$\mu\text{g}/\text{g}$ Kreatinin
Köbberling und v. z. Mühlen (1974)	o PBA	7			Erw.	46,3 $\pm$ 19,9	
Juselius und Barnhart (1974)	o PBA	50			Erw.	18 - 84	
Deck et al. (1976)	o + RIA	31			Erw.	42,5 $\pm$ 22,8	
Chattoraj et al. (1976)	o + RIA	10	10		Erw.	28,23 $\pm$ 33,61	
		10	10		Erw.	27,12 $\pm$ 30,31	
Boscaro et al. (1978)	o RIA	17			Erw.	35 - 140	
Chambers et al. (1980)	o + RIA	24			Erw.	74	
Schöneshöfer et al. (1980a)	o RIA	16			Erw.	144 - 344	
	o RIA	16			Erw.	25,9-127	
	o RIA	16			Erw.	23,0-116	
	o RIA	16			Erw.	15,5-90,7	
Schöneshöfer et al. (1980b)	o HPLC-RIA	16			Erw.	10,5-45,4	
Lantto (1982)	MS	128			Erw.	10,1-42,1	
		20		20	Erw.	15,1-127	

Abkürzungsverzeichnis:

- Erw. = Erwachsene
 w. = weiblich
 m. = männlich
 M. = Monate
 J. = Jahre
 PBA = Proteinbindungssay
 RIA = Radioimmunsay
 FL. = Flüssigkeitschromatographie
 MS = Massenspektrometrie
 HPLC = High Performance Liquid Chromatography
 o = Extraktion mit organischen Lösungsmitteln
 + = Dünnschichtchromatographie
 * = Säulenchromatographie

Tab. 8: Freies Urincortisol bei Kindern und Jugendlichen. Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen. Angegeben sind entweder der Mittelwert $\pm$ 1 Standardabweichung oder der Bereich.

Methode	Anzahl	w.	m.	Alter	$\mu\text{g}/24$ Stunden	freies Urincortisol	
						$\mu\text{g}/\text{g}$ Kreatinin	$\mu\text{g}/\text{m}^2$
o RIA	31	12	19	3-17J.	23,0-115		
		12		3-17J.			
RIA	31		19	3-17J.	74,0-404	99,3 $\pm$ 23,8	41,3 $\pm$ 9,04
						84,5 $\pm$ 24,2	39,0 $\pm$ 7,49
		12	19	3-17J.			
		12	19	3-17J.		342 $\pm$ 66,2	145 $\pm$ 39,9
			19	3-17J.		340 $\pm$ 102	149 $\pm$ 40,2
							4,86 $\pm$ 1,17
							5,59 $\pm$ 1,16

4.2 Methodische Probleme und Interferenzen bei der radioimmunologischen Messung von freiem Urincortisol

Unbestritten bringt der RIA gegenüber dem kompetitiven Proteinbindungssassay wegen seiner vereinfachten Handhabung, höheren Spezifität und geringeren Störfälligkeit viele Vorteile (Thijssen et al. 1980).

Wenn man die im RIA gemessenen, weit zu hohen Werte an freiem Urincortisol mit dem "Sollwert" von weniger als 1 % der Cortisolproduktionsrate vergleicht, kommt man zu dem Ergebnis, daß diese Methode nicht nur freies Urincortisol mißt, sondern daß es zu Interferenzen mit verschiedenen Substanzen gekommen sein muß. Die Frage, welche Substanzen zu Interferenzen führen, ist noch nicht geklärt. In der Diskussion sind sowohl Cortisolmetaboliten im Urin, von denen ein großer Teil noch nicht identifiziert wurde (Murphy et al. 1981), als auch nicht steroidale Substanzen (Boscaro et al. 1981, Chambers et al. 1980, Ruder et al. 1972).

Chambers et al. (1980) verglichen bei Erwachsenen die Aussagekraft einer gaschromatographischen Bestimmung von Cortisolmetaboliten mit der radioimmunologischen Bestimmung von freiem Urincortisol nach Dichlormethanextraktion oder dünnschichtchromatographischer Vorreinigung bei Gesunden und Patienten mit Hypercortisolismus. Die 3 Bestimmungsmethoden waren bei Gesunden eng korreliert. Die aufwendige chromatographische Vorreinigung vor dem RIA ergab keine Vorteile gegenüber der einfach durchzuführenden Vorreinigung mit Dichlormethan. Bei Patienten mit Cushing-Syndrom stieg das im RIA gemessene freie Urincortisol gegenüber den ebenfalls erhöhten Urinmetaboliten (Gaschromatographie) überproportional an. Die Bestimmung des freien Urincortisols scheint also zur Erkennung hyperadrenaler Zustände sensitiver zu sein als die Bestimmung von Urinmetaboliten (Cope und Black, 1959). Dieser Befund kann mit der Theorie des Schwellenphänomens und

der erhöhten Clearance für Cortisol bei hyperadrenalen Zuständen erklärt werden. Gleichzeitig unterstreichen diese Ergebnisse die Bedeutung der Messung des freien Urincortisols bei Verdacht auf ein Cushing-Syndrom.

Schöneshöfer et al. (1980a) zeigten in Untersuchungen über Interferenzen bei RIAs, daß offensichtlich bei Messung des freien Urincortisols ohne Extraktion konjugierte Steroidmetaboliten mitgemessen werden, die in großer Menge im Urin zu finden sind und daher zu sehr hohen Werten führen. Die Entfernung der konjugierten Urinsteroidoide durch Dichlormethan führte zu Werten, die um 2/3 niedriger lagen. Entfernung weniger und stärker polarer Substanzen durch mehrere Trennschritte mit Dichlormethan und Verteilung zwischen Wasser und Tetrachlorkohlenstoff führte zu einer weiteren Verminderung der Interferenzen um ca. 30 %. Die so gewonnenen Werte waren aber immer noch ca. doppelt so hoch wie die gaschromatographisch gewonnenen. In einer weiteren gaschromatographischen Untersuchung zeigten Schöneshöfer et al. (1980b), daß nur 51 % des in ihrem RIA gemessenen Urincortisols aus freiem Urincortisol bestand, 49 % bestand aus noch nicht identifizierten Substanzen, die eine ähnliche Polarität wie Cortisol haben. Diese Substanzen werden in den üblichen Kreuzreaktionsuntersuchungen des Antikörpers nicht erfaßt. In diesem Zusammenhang wird klar, daß die üblichen Kreuzreaktionstests in Forschungsarbeiten (Demers und Derck 1977, Jusellius und Barnhart 1974,) nicht genügen, um eine Aussage über die Spezifität der Methode zu machen.

Murphy et al. (1981) zeigten, daß sich gaschromatographische Messungen und radioimmunologische Messungen ohne und mit Extraktion mit Methylenchlorid zwar in ihrer Höhe unterscheiden, aber eng positiv korreliert sind, so daß radioimmunologische Methoden zwar nicht spezifisch für freies Urincortisol sind, aber eine zuverlässige Aussage über die Funktionslage der NNR bringen. Lantto (1982) verglich massenspektrometrische

Messungen des freien Urincortisols mit radioimmunologischen Messungen nach einfacher Dichlormethanextraktion. Die im RIA gemessenen Konzentrationen waren ungefähr doppelt so hoch wie die Werte der Massenspektrometrie. Die Korrelation mit $r=0,95-0,99$ deutet darauf hin, daß eine enge Beziehung zwischen den interferierenden Substanzen und der jeweiligen Menge an freiem Urincortisol besteht.

Lantto (1982), Murphy et al. (1981) und Schöneschöfer et al. (1980a und 1980b) kamen zu dem Ergebnis, daß die radioimmunologische Messung des freien Urincortisols eine gute Methode für Routineuntersuchungen darstellt. Schöneschöfer et al. (1980a) ist sogar der Meinung, daß die radioimmunologische Messung des freien Urincortisols praktische diagnostische Vorteile haben könnte, eben die Mitbestimmung von Cortisolmetaboliten. In den vorliegenden Untersuchungen an Kindern und Jugendlichen ergab sich beim Vergleich des RIAs mit Extraktion mit dem RIA ohne Extraktion eine enge Korrelation der beiden Methoden mit $r=0,86$ ($p<0,001$). Der Extraktionsvorgang beanspruchte mit Vorbereitung der Proben und Errechnung der Wiederfindung (recovery) ungefähr 4-5 Stunden Arbeit und war mit erheblichem Materialaufwand verbunden. Im RIA ohne Extraktion lagen die Werte zwar um das 2-5fache höher, also weit höher als die tatsächliche Ausscheidung an freiem Urincortisol/die, der RIA mit Extraktion brachte aber keine klinisch besser verwertbare Aussage.

Zu der weitergehenden Vermutung von Schöneschöfer et al. (1980), daß die Höhe der Interferenzen abhängig von einem veränderten Glucocorticoidmetabolismus sei, konnte in den vorliegenden Untersuchungen keine Aussage gemacht werden, denn es ist anzunehmen, daß in unserem RIA mit Extraktion diese interferierenden Substanzen, mit einer dem Cortisol ähnlichen Polarität, mitgemessen wurden. So wird verständlich, daß Cushing-Patienten schon im RIA mit Extraktion sehr hohe Urincortisol-Werte zeigten, und der Quotient $n.\text{extr. Cortisol}/\text{extr. Corti-}$

sol in dieser Untersuchungsgruppe normal oder sogar niedrig-normal war. Es wurde also weder im RIA mit Extraktion noch im RIA ohne Extraktion spezifisch das freie Urincortisol gemessen. Es wäre besser, die gemessene Fraktion als freie Urincorticoide zu bezeichnen (Köbberling und v. z. Mühlen 1972, Murphy et al. 1981).

In unseren beiden Versuchsanordnungen unterschieden sich Adipöse klar von den Cushing-Kranken. Unsere Untersuchungen zeigten, daß der arbeits- und materialsparende RIA ohne Extraktion zur Erkennung des Cushing-Syndroms im Kindesalter und zu seiner Abgrenzung von der alimentären Fettsucht geeignet ist.

4.3. Alters- und Geschlechtsunterschiede des freien Urincortisols

Kenny et al. (1970) zeigten in ihren Untersuchungen, daß die Cortisolproduktionsrate (CPR) allmählich während des Wachstums ansteigt und im Alter leicht abfällt. Peterson (1980) fand die höchste CPR bezogen auf die Körperoberfläche, das Körpergewicht und g Kreatinin bei Neugeborenen unter 5 Tagen, die zweithöchste bei Säuglingen von 5-20 Tagen. Im Alter von 5 Tagen bis zu 20 Jahren korrelierte die CPR am besten mit der Körperoberfläche. Gegenüber der Muskelmasse (Kreatinin als Parameter) nahm die CPR leicht ab. Mylnark et al. (1962) fanden, daß die CPR am besten mit dem Körpergewicht korreliert. Bezogen auf die Körperoberfläche waren die Ergebnisse bei Kindern ab 5 Tagen vergleichbar den Ergebnissen bei Erwachsenen bis 48 Jahren (Kenny et al. 1963). Kenny et al. (1966) fanden einen starken Anstieg der CPR bei Knaben in der Pubertät. Untersuchungen der CPR bezogen auf das Körpergewicht, ergaben eine Konstanz, unabhängig von Alter, Geschlecht und Adipositas (Kenny et al. 1966, Kenny et al. 1970,

Mylmark et al. 1962, O'Connell et al. 1973).

Für freies Urincortisol im Laufe der Entwicklung vom Säuglings- zum Erwachsenenalter liegen noch keine umfassenden Untersuchungen vor.

In der vorliegenden Untersuchung stieg die tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol analog der CPR im Laufe des Wachstums an. Die Ausscheidung an freiem Urincortisol war jedoch weniger abhängig vom Alter als von den Veränderungen der Körpermaße (Körpergewicht, Körperoberfläche, Muskelmasse). Die Ergebnisse unserer radioimmunologischen Untersuchung zeigten einen signifikanten Altersunterschied des freien Urincortisols, bezogen auf die Körperoberfläche, zwischen der Altersgruppe von 3 bis 9 Jahren und der Altersgruppe von 10 bis 17 Jahren im RIA mit Extraktion ($p < 0,02$) und noch deutlicher im RIA ohne Extraktion ($p < 0,001$). Bezogen auf das Kreatinin ergaben sich in der vorliegenden Studie keine signifikanten Altersunterschiede, sondern nur eine minimale Tendenz zu niedrigeren Werten mit zunehmendem Alter. Bezogen auf das Körpergewicht ergaben sich keine altersabhängigen Unterschiede. Ähnliche Befunde erhob Franks (1973) mit einer anderen Methode, dem Proteinbindungssassay. Er fand in seinen Untersuchungen, daß das freie Urincortisol, bezogen auf die Körperoberfläche, langsam im Lauf des Wachstums ansteigt, bis zu den höchsten Werten im Erwachsenenalter. Bezogen auf das Kreatinin, fand er ebenfalls eine leichte Tendenz zu niedrigeren Werten mit zunehmendem Alter. Die Korrelation des freien Urincortisols mit dem Körpergewicht überprüfte er nicht.

In den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich ein schwach signifikanter Geschlechtsunterschied zwischen Mädchen und Knaben beim Vergleich des Quotienten zwischen nicht extrahiertem Cortisol und extrahiertem Cortisol ($p < 0,05$). Statistisch zeigte sich keine Altersabhängigkeit des Quotienten. Der Geschlechtsunterschied war jedoch so gering, daß sich weder im RIA

mit Extraktion, noch im RIA ohne Extraktion bei der Untersuchung Cortisol/kg, Cortisol/m², Cortisol/Kreatinin ein signifikanter Geschlechtsunterschied nachweisen ließ. In der Literatur liegen bisher keine Untersuchungen über Geschlechtsunterschiede bei der radioimmunologischen Messung des freien Urincortisols vor. Nakamura und Yakata (1984) fanden in ihren gaschromatographischen Untersuchungen signifikante Geschlechtsunterschiede beim Vergleich der absoluten Mengen an freiem Urincortisol bei Kindern und Erwachsenen, die sich ausgleichen ließen, wenn man die freie Urincortisolmenge auf die tägliche Ausscheidung von Kreatinin bezog. Einen Geschlechtsunterschied in der Ausscheidung an freiem Urincortisol beobachtete Lantto (1982) bei Erwachsenen. In seinen Untersuchungen lagen die Werte für Männer signifikant höher als für Frauen. Keinen Unterschied bei Erwachsenen dagegen fanden Rosner et al. (1963) mit einer chromatographischen Methode und Köbberling und von zur Mühlen (1974) mit einem Proteinbindungsassay. Bei den beschriebenen Untersuchungen fehlen jedoch Angaben über Unterschiede im Körpergewicht.

4.4. Bezugssysteme

Die meisten Untersucher gaben die mit unterschiedlichen Methoden gewonnenen Ergebnisse als Menge an freiem Urincortisol pro Tag an, ohne sie auf Parameter wie Körperoberfläche, Körpergewicht oder Kreatinin zu beziehen. Diese Messungen bezogen sich jedoch fast alle auf das freie Urincortisol bei Erwachsenen. Bei ihren Untersuchungen an Erwachsenen (PBA) gingen Köbberling und von zur Mühlen (1972) davon aus, daß das freie Urincortisol unabhängig vom Körpergewicht sei, da es nicht vom Cortisolmetabolismus beeinflusst werde. Rosner et al. (1963) (Glasfaserchromatographie) bestätigten

diese Auffassung.

Unterschiede des Körpergewichts sind bei Erwachsenen zwar vorhanden, aber bei weitem nicht in dem Ausmaß wie bei Kindern, bei denen das Körpergewicht im Laufe des Wachstums um über 900 %, die Körperoberfläche um ca. 300 % steigt. Da das Plasmavolumen und der Verteilungsraum der Glucocorticoide im Körper mit zunehmendem Körpergewicht ansteigen, müßten eigentlich die Gesamtglucocorticoidmenge im Körper und die Gesamtausscheidung sowohl des freien Urincortisols als auch der Cortisolmetaboliten im Urin zunehmen. Theoretisch müßten also durch Bezugsparameter, die den Verteilungsraum beinhalten, Unterschiede in der Cortisolausscheidung ausgeglichen werden können. Hierfür bietet sich an, die tägliche Ausscheidung des freien Urincortisols auf die Körperoberfläche, das Körpergewicht oder die tägliche Kreatininausscheidung zu beziehen.

Mit einer fluorometrischen Methode zeigte Stolecke (1973), daß bei Kindern das freie Urincortisol unabhängig vom Alter ist, wenn man es auf die Körperoberfläche bezieht. Sonino et al. (1981) bestimmten radioimmunologisch das freie Urincortisol bei Kindern. Die gefundenen Werte korrelierten gut mit der Körperoberfläche. Somit gelang es den Untersuchern, die Ausscheidung an freiem Cortisol von kleinen Kindern mit der von sehr großen Kindern zu vergleichen.

Bei gaschromatographischen Untersuchungen zeigte sich, daß sich der prozentuale Anteil verschiedener Urinsteroidmetaboliten während des Wachstums ändert und die Mengen der einzelnen Metaboliten stärker vom Körpergewicht abhängig sind als von der Körperoberfläche und dem Kreatinin (Savage et al. 1975).

Burke und Beardwell (1972) fanden bei Erwachsenen eine gute Korrelation zwischen der Cortisolausscheidung und der Kreatininausscheidung. Walker (1977) hielt nach Untersuchungen bei Erwachsenen sogar die Bestimmung des Morgenurins bei der Diagnosestellung einer NNR-Funktionsstörung für aussagekräftig, wenn man die

Cortisolausscheidung auf die Kreatininausscheidung bezieht. Canalis et al. (1982) kamen beim Vergleich der freien Cortisolausscheidung (Flüssigkeitschromatographie) zwischen Erwachsenen und Kindern (4 - 15 Jahre) zu dem Ergebnis, daß das freie Urincortisol bei Kindern, wenn man es auf die Körperoberfläche oder die tägliche Kreatininausscheidung bezieht, gleich oder leicht höher ist als das bei Erwachsenen. Franks (1973) fand bei seinen Untersuchungen an 30 Kindern und 11 Erwachsenen, daß das freie Urincortisol/m² mit zunehmendem Alter ansteigt, das freie Urincortisol/g Kreatinin eher abfällt, aber besser vergleichbar für die verschiedenen Altersstufen ist. Er kam damit zu den gleichen Ergebnissen wie Kenny et al. (1970) bei der Messung der GPR und Nakamura und Yakata (1984) mit ihrer gaschromatographischen Methode.

In einer Übersichtsarbeit empfahl Hughes (1982), bei der Bestimmung des freien Urincortisols das Urinkreatinin mitzumessen, nicht nur als Bezugsparameter zum Ausgleich von Variablen sondern auch, um eine Aussage über die Vollständigkeit des 24-Stundenurins treffen zu können (Koch et al. 1980, Narayanan und Appleton 1980, Turner und Cohn 1975, Zorab 1969).

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen stimmen mit den oben beschriebenen Ergebnissen von Franks (1973), Kenny et al. (1970), und Nakamura und Yakata (1984) überein. In unseren Untersuchungen korrelierte das Körpergewicht eng mit der täglichen Cortisolausscheidung. Diese Korrelation blieb während des Wachstums konstant. Das freie Urincortisol, bezogen auf die Körperoberfläche, nahm im Laufe des Wachstums leicht zu. Das freie Urincortisol, bezogen auf die Kreatininausscheidung, blieb konstant mit einer Tendenz zu niedrigeren Werten bei Knaben ab der Pubertät. Beide Bezugssysteme, Cortisol bezogen auf das Körpergewicht und Cortisol bezogen auf die tägliche Kreatininausscheidung, sind gleich aussagekräftig. Bei Adipösen stieg die tägliche Kreatininausscheidung überpro-

portional an. Die tägliche Ausscheidung an Cortisol pro g Kreatinin lag in der Gruppe der Adipösen normal bis normal-niedrig. In den vorliegenden Untersuchungen erlaubte das Cortisol bezogen auf das Kreatinin eine vollständige Unterscheidung der Adipösen, die sich nicht von der Normalgruppe unterschieden, von den Cushing-Patienten und sogar von dem Patienten mit dem klinisch mild verlaufenden Morbus-Cushing.

Der aufwendigere Assay mit Extraktion ergab bei allen drei Bezugsparametern gegenüber dem Assay ohne Extraktion keine Mehraussage.

4.5. Adipöse Patienten

Die Frage, ob Adipöse eine höhere Ausscheidung an freiem Urincortisol zeigen, wird unterschiedlich beantwortet. Normalwerte in ihren Untersuchungen mit unterschiedlichen Methoden fanden Rosner et al. (1963), Harris und Crane (1964), Murphy (1968), Köbberling und von zur Mühlen (1972). Eine erhöhte Ausscheidung an freiem Urincortisol fanden Karl und Raith (1961), Schteingart et al. (1963), Knorr und Lauter (1967), Franks (1973), Burke und Beardwell (1973) und Hughes (1982), allerdings ohne die tägliche Cortisolausscheidung auf Parameter, die eine Aussage über die Körpermaße erlauben, zu beziehen. Eine Aussage über radioimmunologisch gemessenes freies Urincortisol bei Adipösen liegt bis jetzt in der Literatur nicht vor. In den vorliegenden Untersuchungen zeigten die Adipösen eine für ihre Altersgruppe erhöhte Ausscheidung an freiem Urincortisol. Kein Unterschied zwischen dem Normalkollektiv und den Adipösen ergab sich, wenn man die tägliche Urincortisolausscheidung auf die tägliche Kreatininausscheidung bezog. Franks (1973), der eine erhöhte Kreatininausscheidung bei Adipösen feststellte, und Burke und Beardwell (1973) kamen zu den gleichen

Ergebnissen. Bezogen auf das Körpergewicht, ergab sich in den vorliegenden Untersuchungen ebenfalls kein Unterschied zwischen dem Normalkollektiv und den Adipösen. Bezogen auf die Körperoberfläche, lag ein Teil der Adipösen leicht höher als die Normalgruppe, anders als bei Franks (1973), bei dem sich die Gruppe der Adipösen in ihrem freien Urincortisol, bezogen auf die Körperoberfläche überhaupt nicht von den gesunden Kindern unterschied. Seine Gruppe der Adipösen bestand allerdings nur aus 4 Probanden.

4.6. Hospitalisierung und Stress

Stress jeglicher Art kann zu einer Erhöhung der Glucocorticoidausschüttung führen. Im Einzelfall ist schwer vorauszusagen, in welchem Maße sich die Glucocorticoidausschüttung ändert. Dabei spielt einer die Dauer einer Erkrankung als die Schwere eine wichtige Rolle (Espiner 1966). Bei akut Kranken kann sogar der Cortisol-Tagesrhythmus gestört sein (Eik Nes 1957, Iturzaeta et al. 1969). Bei Operationen ist die Schwere des geplanten Eingriffs ausschlaggebend. Präoperativ kann psychische Anspannung im Einzelfall zu stark erhöhten Cortisolspiegeln führen, ohne daß es sich hierbei um betont ängstliche Patienten handelt. Untersuchungen des freien Urincortisols bei hospitalisierten Patienten, vor allem prä- und postoperativ und im akuten Stadium einer Erkrankung führen zu kaum interpretierbaren Werten. Köbberling und von zur Mühlen (1974) gaben an, daß bei Erwachsenen Hospitalisierung allein, ohne geplante invasive Eingriffe, zu signifikanter Erhöhung der Ausscheidung an freiem Urincortisol führen kann.

In der hier untersuchten Gruppe der hospitalisierten Kinder variierte die tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol weit. Sie reichte von normal-niedrigen

Werten bis in hochpathologische Bereiche, unabhängig vom jeweiligen Bezugssystem. Franks (1973) kam bei seinen Untersuchungen an 8 hospitalisierten Kindern zu den gleichen Ergebnissen mit großen Überschneidungen zwischen Normalen, Hospitalisierten und Cushing-Patienten unabhängig vom Bezugssystem. Nach unseren Untersuchungen kann das freie Urincortisol bei hospitalisierten Kindern wegen des nicht voraussagbaren Einflusses von Stress nicht mit dem ambulanter Patienten verglichen werden. Die in unseren Untersuchungen aufgestellten Normalwerte gelten also nur für 24-Stundenurine, die ambulant gesammelt wurden.

4.7. Cushing-Syndrom

Die Patienten mit Cushing-Syndrom lagen mit Ausnahme des klinisch milden Cushingverlaufes (Zustand nach Entfernung eines Hypophysenadenoms) in allen Darstellungsweisen weit höher als die Normalgruppe und die Gruppe der Adipösen. Bemerkenswert war, daß der Patient mit NNR-Adenom die höchste Ausscheidung an freiem Urincortisol pro Tag zeigte.

Wegen der geringen Anzahl an Cushing-Patienten konnte über falsch positive oder falsch negative Ergebnisse des Testsystems keine Aussage gemacht werden. Es stellte sich jedoch heraus, daß die vorliegenden Versuchssysteme, gerade auch der wenig aufwendige Versuch ohne Extraktion, eine klare Aussage über die NNR-Funktionslage ermöglichen.

4.8. Wertigkeit des freien Urincortisols in einzelnen Urinproben

Walker (1977) gab nach Untersuchungen bei Erwachsenen an, daß die Bestimmung des freien Urincortisols im Morgenurin, bezogen auf die Kreatininausscheidung, die Bestimmung des freien Urincortisols im 24-Stundenurin ersetzen könnte.

In den vorliegenden Untersuchungen an Kindern führte die Betrachtung der morgendlichen Ausscheidung an freiem Urincortisol, bezogen auf das Kreatinin, zu keinen eindeutigen Ergebnissen. Neben der hohen morgendlichen Ausscheidung an Cortisol zeichnete sich eine Tendenz zu einer hoher Cortisolausscheidung bis in die Mittagsstunden ab.

Eine beliebige Urinportion, untersucht auf freies Urincortisol pro g Kreatinin, führte zu überhaupt keiner Aussage in der Beurteilung der NNR-Funktionslage. Die Kreatininausscheidung korrelierte zwar über 24 Stunden quantitativ mit der Ausscheidung an freiem Urincortisol, war aber in ihrem Rhythmus nicht korreliert, was gerade in kurz aufeinanderfolgenden Urinportionen auffiel. Eine Aussage über die Richtung der zeitlichen Verschiebung konnte nicht gemacht werden.

Mit der Einschränkung der nicht standardisierten Sammelzeitpunkte läßt sich die Aussage treffen, daß die Messung des freien Urincortisols im Morgenurin keine Rückschlüsse auf die Funktionslage der NNR erlaubt. Für einen festen Zeitraum, möglicherweise 20-12 Uhr mittags könnten eventuell brauchbare Ergebnisse gewonnen werden. Eine Untersuchung des Morgenurins wird nicht empfohlen, da einige Kinder eine hohe Cortisolausscheidung in den Vormittagsstunden zeigen, die in Einzelfällen sogar die Cortisolmenge im Morgenurin überschreitet.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Untersuchung war, einen für Cortisol im Plasma standardisierten RIA auf die Gegebenheiten im Urin zu adaptieren und verbindliche Referenzwerte für die Ausscheidung an freiem Urincortisol bei ambulanten Kindern und Jugendlichen (3-17 Jahre) aufzustellen. Neben den Urinen von gesunden Probanden wurden 24-Stundenurine von ambulanten adipösen Patienten, hospitalisierten Patienten im Stadium der Rekonvaleszenz und von Cushing-Patienten untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war, eine Aussage treffen zu können, ob Adipositas und Hospitalisierung die Ausscheidung an freiem Urincortisol beeinflussen, und ob mit der verwendeten Methode eine klare Unterscheidung zwischen Gesunden, Adipösen und Hospitalisierten auf der einen Seite und Cushing-Patienten auf der anderen Seite erreicht werden kann.

Um auch die Wertigkeit einer beliebigen Urinprobe zu untersuchen, wurde bei dem größten Teil der gesunden Kinder der 24-Stundenurin portioniert gesammelt und jede Portion einzeln bestimmt.

Die tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol wurde auf die Parameter Körpergewicht, Körperoberfläche und tägliche Kreatininausscheidung bezogen. Auf diese Weise wurde versucht, Größen- und Altersunterschiede auszugleichen, um die Ausscheidung an freiem Urincortisol bei Kindern unterschiedlichen Alters miteinander vergleichbar zu machen.

Die tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol wurde einmal in einem RIA nach Vorreinigung bestimmt, das andere mal durch Bestimmung des verdünnten Nativurins.

Die Ergebnisse des RIAs mit Extraktion und des RIAs ohne Extraktion waren eng positiv korreliert ($r=0,86$). Der RIA ohne Extraktion ergab 2,6-5,7 mal höhere Werte als der RIA mit Extraktion. Statistisch wurde ein signifikanter Geschlechtsunterschied festgestellt,

dessen Ursache ungeklärt blieb.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigten, daß das freie Urincortisol im Lauf des Wachstums ansteigt (23,0-115 µg/die im RIA mit Extraktion und 74,0-404 µg/die im RIA ohne Extraktion).

Es zeigte sich, daß das freie Urincortisol weniger eng mit dem Alter als mit den Parametern Körpergewicht, Körperoberfläche und Kreatinin korreliert ist.

Bezogen auf das Körpergewicht, war die Ausscheidung an freiem Urincortisol in den zwei RIAs für beide Geschlechter gleich und blieb im Lauf des Wachstums konstant ($1,39 \pm 0,27$ µg/kg bzw. $5,30 \pm 1,20$ µg/kg).

Wurde das freie Urincortisol auf die Körperoberfläche bezogen, fand sich ein geschlechtsunabhängiger schwach signifikanter Unterschied zwischen den Altersgruppen <10 Jahre und >10 Jahre ($36,1 \pm 7,39$ µg/m² gegenüber $43,4 \pm 7,17$ µg/m² im RIA mit Extraktion, $131 \pm 32,5$ µg/m² gegenüber $176 \pm 34,4$ µg/m² im RIA ohne Extraktion).

Das freie Urincortisol, bezogen auf die tägliche Kreatininausscheidung, blieb mit $90,2 \pm 24,7$ µg/g im RIA mit Extraktion und $341 \pm 88,4$ µg/g im RIA ohne Extraktion im Lauf des Wachstums konstant. Ein signifikanter Geschlechtsunterschied wurde nicht festgestellt, wenn auch Mädchen ab 12 Jahren eine leicht höhere Ausscheidung, bezogen auf das Kreatinin, zeigten.

Die Bestimmung des freien Urincortisols im Morgenurin und in einzelnen Urinportionen über den Tag verteilt, bezogen auf die tägliche Kreatininausscheidung, ermöglichte es nicht, eine Aussage über die NNR-Funktionslage zu treffen.

Die adipösen Kinder und Jugendlichen unterschieden sich nicht vom Normalkollektiv, wenn man die tägliche Ausscheidung an freiem Urincortisol auf das Körpergewicht oder die tägliche Kreatininausscheidung bezog. Bezogen auf die Körperoberfläche, lag ein Teil der Adipösen leicht höher als das Normalkollektiv.

Die hospitalisierten Patienten variierten in ihrer

Ausscheidung an freiem Urincortisol zwischen niedrigen und hochpathologischen Werten, unabhängig vom Bezugssystem. Der Einfluß von Hospitalisierung als Stressfaktor konnte im Einzelfall nicht abgeschätzt werden und war unabhängig von der Schwere der vorausgehenden Erkrankung.

Die Patienten mit Cushing-Syndrom lagen, mit Ausnahme des Falles mit klinisch mildem Cushingverlauf, in allen Bezugssystemen weit höher als die Normalgruppe und die Gruppe der Adipösen.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß die radioimmunologische Messung des freien Urincortisols eine geeignete Untersuchung in der Diagnostik des Cushing-Syndroms darstellt. Der aufwendigere RIA mit Extraktion weist keine Vorteile gegenüber der einfacher und schneller durchführbaren radioimmunologischen Untersuchung von verdünntem Nativurin auf. Der RIA ohne Extraktion ist somit als Routinemethode geeignet.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Appleby, J.I., Gibson, G., Norymberski, J.K.,
 Stubbs, R.D.:
 Indirect analysis of corticosteroids.
 Biochem. J. 60: 453, 1955

- 2 Apter, D., Jänne, O., Viikari, R.:
 Lipidex chromatography in the radioimmunoassay
 of serum and urinary cortisol.
 Clin. Chim. Acta 63:139, 1975

- 3 Auchter, B.:
 Standardisierung und Prüfung eines schnellen
 und billigen Verfahrens zur direkten
 radioimmunologischen Bestimmung von Cortisol
 in Plasma oder Serum ohne Extraktion.
 Inaug. Diss., LMU München 30 ff. 1978

- 4 Ayres, P.J., Garrod, O., Simpson, S.A., Tait,
 J.F.:
 A method for the determination of aldosterone
 cortisol and corticosterone in biological
 extracts, particularly applied to human urine.
 Biochem. J. 65: 639, 1957

- 5 Belsel, W.R., Cos, J.J., Horton, R., Chao,
 P.Y.,
 Forsham, P.H.:
 Physiology of urinary cortisol excretion.
 J. clin. Endocr. 24:887, 1964

- 6 Bellastella, A., Criscuolo, T., Mango, A.,
 Perrone, L., Sinisi, A.A., Faggiano, M.:
 Circannual rhythms of plasma luteinizing
 hormone, follicle-stimulating hormone,

- testosterone, prolactin and cortisol in
prepuberty.
J. clin. Endocr. 19:453, 1983
- 7 Bidlingmaier, F., Witt, I.:
 Normalwerte im Harn
 in: Wiskott, A., Betke, K., Künzer, W., (Eds.),
 Lehrbuch der Kinderheilkunde, Stuttgart, 35.6
 , 1977
- 8 Boscaro, M., Karbowiak, J., Mantero, F.:
 Free urinary cortisol radioimmunoassay.
 Rio. Clin. Lab. 8:169, 1978
- 9 Brombacher, P.J., Gijzen, A.H.J., Janssens,
 H.H.P., Soons, M.P.J.:
 The raising and characterization of
 cortisol-binding antiserum.
 Clin. Chim. Acta 58:173, 1975
- 10 Brooks, R.V., Supre, J., Gogate, A.N., Mills,
 I.H., Prunty, F.T.G.:
 Appraisal of adrenocortical hyperfunction.
 Patients with cushing's syndrome or
 "non-endocrine" tumors.
 J. clin. Endocr. 23:725, 1963
- 11 Burke, G.W., Beardwell, C.G.:
 Urinary free cortisol and compound S in
 cushing's syndrome.
 In: Binder, C., Hall, P.E. (Eds.)
 Cushing's syndrome, S. 53, London 1972
- 12 Burke, C.W., Beardwell, C.G.:
 Cushing's syndrome.
 Quart. J. Med. 42:175, 1973
- 13 Burke, C.W., Roulet, F.:

- Increased exposure of tissues to cortisol in late pregnancy.
Br. Med. J. 1:657, 1970
- 14 Canalis, E., Reardon, G. E., Caldarella, A. M.:
A more specific liquid-chromatographic method for free cortisol in urine.
Clin. Chem. 28:2418, 1982
- 15 Carballeira, A., Fishman, L. M., Jakobi, J. D.:
Dual sites of inhibition by metyrapone of human adrenal steroidogenesis: Correlation of in vivo and in vitro studies.
J. clin. Endocr. 42:687, 1976
- 16 Chambers, R.E., Willets, S.R., Walters G.:
A comparison of urine free cortisol (RIA) with cortisol metabolites (GLC) for detecting increased cortisol secretion.
Ann. Clin. Biochem. 17:233, 1980
- 17 Chatteraj, S.C., Turner, A.K., Pinkus, J.L., Charles, D.:
The significance of urinary free cortisol and progesterone in normal and anencephalic pregnancy.
Am. J. Obst. Gynecol. 124:953, 1976
- 18 Clark, L.C., Thompson, H.L., Beck, E.I., Jacobson, W.:
Excretion of creatine and creatinine by children.
Am. J. Dis. Child. 81:774, 1951
- 19 Cope, C.L., Black, E.G.:
The reliability of some adrenal function tests.
Brit. Med. J. 28:1117, 1959

- 20 Crapo, L.:
Cushing's syndrome: A review of diagnostic tests.
Metab. Clin. Exp. 28:955, 1979
- 21 Deck, K.A., Eberlein, L., Vetter, H., Hillen, H.:
Die Bestimmung von freiem Cortisol im Urin.
Dtsch. Med. Wschr. 101:818, 1976
- 22 Demers, L., Derck, D.D.:
Comparison of competitive protein binding analysis and radioimmunoassay for the determination of cortisol in serum and urine.
Clin. Biochem. 10:104, 1977
- 23 Doe, R.P., Zinneman, H.H., Flink, E.B., Ulstrom, R.A.:
Significance of the concentration of nonprotein-bound plasma cortisol in normal subjects, Cushing's syndrome, pregnancy, and during estrogen therapy.
J. clin. Endocr. 20:1484, 1960
- 24 Dunkelman, S.S., Fairhurst, B., Plager, J., Waterhouse, E.C.:
Cortisol metabolism in obesity.
J. clin. Endocr. 24:832, 1964
- 25 Eik-Nes, K.:
Determination of 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids in blood plasma.
J. clin. Endocr. 17:502, 1957
- 26 Espiner, E.A.:
The relation between free cortisol in urine and

- 'urinary free 11-hydroxycorticosteroids' as measured by fluorescence.
J. Endocr. 33:233, 1965
- 27 Espiner, E.A.:
Urinary cortisol excretion in stress situations and in patients with Cushing's syndrome.
J. Endocr. 35:29, 1966
- 28 Foster, L.B., Dunn, R.T.:
Single-antibody technique for radioimmunoassay of cortisol in unextracted serum or plasma.
Clin. Chem. 20:365, 1974
- 29 Franks, R.C.:
Urinary 17-hydroxycorticosteroid and cortisol excretion in childhood.
J. clin. Endocr. 36:702, 1973
- 30 Gerdes, H., Teller, W.M.:
Neue methodische Möglichkeiten zur klinischen Funktionsdiagnostik der Nebennierenrinde.
Z. ges. exp. Med. 142:222, 1967
- 31 Gold, N., Crigler, J.F.:
Influence of L-triiodothyronine on steroid hormone metabolism: studies in a patient with adrenal hyperplasia (Cushing's syndrome).
J. clin. Endocr. 23:156, 1963
- 32 Harris, J.J., Crane, M.G.:
Urinary cortisol excretion as a test of adrenal cortical function.
Metabolism, 13:45, 1964
- 33 Harrison's Principles of Internal Medicine

Tenth Edition, Mc Graw-Hill Book Company, 641 ff, 1983

- 34 Haycock, G.B., Schwartz, G.J., Wisotsky, D.H.:
Geometric method for measuring body surface
area: a height-weight formula validated in
infants, children and adults.
J. Ped. 93:62, 1978
- 35 Hellmann, L., Bradlow, H.L., Zumoff, B.,
Gallagher, T.F.:
The influence of thyroid hormone on
hydrocortisone production and metabolism.
J. clin. Endocr. 21:1231, 1961
- 36 Hellmann, L., Nakada, F., Curti, J., Weitzman,
E.D., Kream, J., Roffwarg, H., Ellman, S.,
Fukushima, D.K., Gallagher, T.F.:
Cortisol is secreted episodically by normal
man.
J. clin. Endocr. 30:411, 1970
- 37 Hsu, T.H., Bledsoe, T.:
Measurement of urinary free corticoids by
competitive protein-binding radioassay in
hypoadrenal states.
J. clin. Endocr. 30:443, 1970
- 38 Hughes, I.A.:
Congenital and acquired disorders of the
adrenal cortex.
Clinics in Endocrinology and Metabolism,
11:89, 1982
- 39 Iturzaeta, N.F., Fine, J., Richards, C., Kenny,
F.:
Effect of surgery on cortisol secretion rate
(CSR) in normal and steroid-treated children.

- J. Pediatr. 74:82, 1969
- 40 Jaffe, M.,
Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in
normalem Harn erzeugt und über eine neue
Reaktion des Kreatinins.
Z. Physiol. Chem. 10:391, 1886
- 41 Juselius, R.E., Barnhart, F.:
Competitive protein-binding radioassay of
urinary cortisol.
Clin. Chem. 20:1470, 1974
- 42 Karl, H.J., Raith, L.:
Cortisol secretion and cortisol degradation
products in the urine of obese subjects in
comparison to normals.
Klin. Wochenschrift, 39:702, 1961
- 43 Kenny, F.M., Malvaux, P., Migeon, C.J.:
CPR in newborn babies, older infants and
children.
Pediatrics 31:360, 1963
- 44 Kenny, F.M., Gancayco, G.P., Helad, F.P., Hung,
W.:
Cortisol production rate in adolescent males in
different stages of sexual maturation.
J. clin. Endocr. 26:1232, 1966
- 45 Kenny, F.M., Richards, C., Taylor, F.H.:
Reference standards for cortisol production and
17-hydroxy-corticosteroid excretion during
growth: variation in the pattern of excretion
of radiolabeled cortisol metabolites.
Metabolism 19:280, 1970
- 46 Knorr, D., Lauter, H.:

Veränderte Tagesrhythmik der Cortisolausscheidung bei fettsüchtigen Kindern.

Klin. Wochenzeitschrift, 15:792, 1967

- 47 Köbbberling, J., von zur Mühlen, A.:
Methodische Untersuchungen zur Bestimmung der freien Harn Corticoide mit der Proteinbindungsmethode.
Z. Klin. Chem. klin. Biochem. 10:495, 1972
- 48 Köbbberling, J., von zur Mühlen, A.:
The circadian rhythm of free cortisol determined by urine sampling at two-hour intervals in normal subjects and in patients with severe obesity.
J. clin. Endocr. 38:313, 1974
- 49 Koch, C.D., Arnst, E., Rommel, K.:
Harnstoff, Kreatinin, Harnstoff- und Kreatinin-Clearance: Untersuchungen an 25 gesunden Probanden über ein Jahr.
J. clin. Chem. clin. Biochem. 18:423, 1980
- 50 Krieger, D.T., Allen, W., Rizzo, F., Krieger, H.P.:
Characterization of the normal temporal pattern of plasma corticosteroid levels.
J. clin. Endocr. 32:266, 1971
- 51 Kunze, D., Murken, J. D.:
Diagnostik von Längenalter und Gewichtsalter mit neuen Somatogrammen.
Kinderarzt, 12:1077, 1974
- 52 Labhart, A., Müller, J.:
Die Steuerung der Cortisolkonzentration im Plasma.

In: Labhart, A. (Ed.): Klinik der inneren Sekretion. Berlin-Heidelberg-New York, 300, 1980

- 53 Lautto, O.:
Radioimmunoassay and liquid-chromatographic analysis for free cortisol in urine compared with isotope dilution-mass spectrometry.
Clin. Chem. 28:1129, 1982
- 54 Liddle, G.W.:
Tests of pituitary-adrenal suppressibility in the diagnosis of cushing's syndrome.
J. clin. Endocr. 20:1539, 1960
- 55 Martin, M.M., Hamman, B.L.:
Patterns of urinary excretion of steroids in cushing's syndrome.
J. clin. Endocr. 26:257, 1966
- 56 Mason, J.W.:
Psychological influences of the pituitary-adrenal cortical system.
Recent Prog. Horm. Res. 15:345, 1959
- 57 Mattingly, D., Dennis, P.H., Pearson, J., Cope, C.L.:
Rapid screening test for adrenal cortical function.
Lancet 2:1046, 1964
- 58 Migeon, C., Green, D.C., Eckert, J.P.:
Study of adrenocortical function in obesity.
Metabolism 12:718, 1963
- 59 Mlynaryk, P., Gillies, R.R., Murphy, B., Pattée, C.J.:
Cortisol production rates in obesity.

- 60 Müller, J.:
Abbau und Ausscheidung der Nebennieren-
rinden-Hormone.
In: Labhart, A. (Ed.): Klinik der inneren
Sekretion. Berlin-Heidelberg-New York, 289,
1980
- 61 Murphy, B.E.P.:
Some studies of the protein-binding of steroids
and their application to the routine micro and
ultramicro measurement of various steroids in
body fluids by competitive protein-binding
radioassay.
J. clin. Endocr. 27:973, 1967
- 62 Murphy, B.E.P.:
Clinical evaluation of urinary cortisol
determinations by competitive protein-binding
radioassay.
J. clin. Endocr. 28:343, 1968
- 63 Murphy, B.E.P., Okouneff, L.M., Klein, G.P.,
Ngo, S.C.:
Lack of specificity of cortisol determinations
in human urine.
J. clin. Endocr. 53:91, 1981
- 64 Nakamura, J., Yakata, M.:
Age- and sex-related differences in urinary
cortisol levels.
Clin. Chim. Acta 137:77, 1984
- 65 Narayanan, S., Appleton, H.D.:
Creatinine: a review

- 66 Nichols, T., Nugent, C. A., Tyler, F. H.:
Steroid laboratory tests in the diagnosis of
cushing's syndrome.
Am. J. Med. 45:116, 1968
- 67 Norymberski, J.K., Stubbs, R.D., West, H.F.:
Assessment of adrenocortical activity by assay
of 17-ketogenic steroids in urine.
Lancet 1:1272, 1953
- 68 O'Connell, M., Danforth, E., Horton, E.S.,
Salans, L.B., Sims, E.A.H.:
Experimental obesity in man . III.
Adrenocortical function.
J. clin. Endocr. 36:323, 1973
- 69 Petersen, K.E.:
The production of cortisol and corticosterone
in children.
Acta Paediatr. Scand. 69:281, 1980
- 70 Peterson, R.E., Wyngaarden, J.B., Guerra,
S.L., Brodie, B.B., Bunim, J.J.:
The physiological disposition and metabolic
fate of hydrocortisone in man.
J. clin. Invest. 34:1779, 1955
- 71 Petraglia, F., Facchinetti, F., Parrini, D.,
Micieli, G., de Luca, S., Genazzani, A.:
Simultaneous circadian variations of
plasma-ACTH, Beta-lipotropin, Beta-endorphin,
and cortisol.
Hormone Res. 17:147, 1983
- 72 Phillipou, G.:
Investigation of urinary steroid profiles an

- diagnostic method in cushing's syndrome.
J. clin. Endocr. 16:433, 1982
- 73 Pinsker, P., Bultasova, H., Svoboda, J.:
Diagnostic value of the simultaneous
determination of urinary free and conjugated
cortisol in cushing's syndrome.
Acta Endocr. 58:183, 1968
- 74 Porter, C.C., Silber, R.H.:
A quantitative reaction for cortisone and
related 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids.
J. biol. Chem. 185:201, 1950
- 75 Quenon, M., Henry, P., Lejeune-Lenain, C.,
Wolter, R., Franckson, R.M.:
Determination of reference standards for
adrenal steroids excretion in normal
prepuberal children.
Ann. Biol. Clin. 38:95, 1980
- 76 Ratcliff, C.R., Hall, F.F.:
Fluorometric measurement of urinary free
hydrocortisone (cortisol).
Clin. Chem. 19:1400, 1973
- 77 Richtlinien zur Durchführung von Maßnahmen der
statistischen Qualitätskontrolle und von
Ringversuchen in der Heilkunde (Deutsches
Ärzteblatt 68:2228, aufgrund des "Gesetzes
über das Mess- und Wiewesen (Eichgesetz)" v.
11. Juli 1969, BGB v. 15. Juli 1969, Teil 1, S.
759 ff., und der "Verordnung über Ausnahme von
der Eichpflicht
(Eichpflichtausnahmeverordnung)" vom 26. Juni
1970, Bundesgesetzblatt v. 30. Juni 1970, S.
960 ff.

- 78 Rolleri, E., Zannino, M., Orlandini, S.,
 Malvano, R.:
 Direct radioimmunoassay of plasma cortisol.
 Clin. chim. Acta 66:319, 1976
- 79 Rosner, J.M., Cos, J.J., Biglieri, E.G., Hane,
 S., Forsham, P.H.:
 Determination of urinary unconjugated cortisol
 by glass fiber chromatography in the diagnosis
 of cushing's syndrome.
 J. clin. Endocr. 23:820, 1963
- 80 Ruder, H.J., Guy, R.L., Lipsett, M.B.:
 A radioimmunoassay for cortisol in plasma and
 urine.
 J.clin. Endocr. 35:219, 1972
- 81 Savage, D.C.L., Forsyth, C.C., McCafferty, E.,
 Cameron, J.:
 The excretion of individual adrenocortical
 steroids during normal childhood and
 adolescence.
 Acta endocr. 79:551, 1975
- 82 Sayegh, J.F., Vestergaard, P.:
 Multi-column chromatography of neutral urinary
 steroids and metyrapone testing.
 Acta endocr. 10, Suppl. 217:201, 1978
- 83 Schöneshöfer, M., L'Age, M., Oalkers, W.:
 Short time kinetics of deoxycorticosterone,
 deoxycortisol, corticosterone and cortisol
 during single dose metyrapone test.
 Acta endocr. 85:190, 1977
- 84 Schöneshöfer, M., Fenner, A., Dulce, H.J.:
 Interferences in the radioimmunological
 determination of urinary free cortisol.

- 85 Schöneshöfer, M., Fenner, A., Altinok, G.,
 Dulce, H.J.:
 Specific and practicable assessment of urinary
 free cortisol by combination of automatic
 high-pressure liquid chromatography and
 radioimmunoassay.
 Clin. chim. Acta, 106:63, 1980b
- 86 Schteingart, D.E., Gregerman, R.I., Conn J.W.:
 A comparison of the characteristics of
 increased adrenocortical function in obesity
 and in cushing's syndrome.
 Metabolism 12:484, 1963
- 87 Selye, H.:
 The general adaption syndrome
 J. clin. Endocr. 6:117, 1946
- 88 Sholiton, L.J., Werk, E.E., Harnwell, R.T.:
 Diurnal variation of adrenocortical function
 in non-endocrine disease states.
 Metabolism 10:632, 1961
- 89 Sokolowski, G., Wood, W.G.:
 Radioimmunoassay in Theorie und Praxis.
 Konstanz, 57 ff, 143 ff, 1981
- 90 Solomon, I.L., Schoen, E.J.:
 Juvenile cushing syndrome manifested primarily
 by growth failure.
 Am. J. Dis. Child. 130:200, 1976
- 91 Sonino, N., Chow, D., Levine, L.S., New, M.I.:
 Clinical response to metyrapone as indicated by
 measurement of mineralocorticoids and
 glucocorticoids in normal children.

- 92 Stolecke, H.:
The determination of free urinary cortisol-A
modification of the method described by Gerdes
and Staib and normal values in infants.
Horm. Metab. Res. 2:298, 1970
- 93 Stolecke, H.:
Normal values of free urinary cortisol in
infants and children.
Horm. Metab. Res. 5:64, 1973
- 94 Stolecke, H.:
Free urinary cortisol as a representative
steroid of the urinary
Porter-Silber-Chromogens.
Acta Endocr. 70:65, 1972
- 95 Streeten, D.H.P., Stevenson, C.T., Dalakos,
T.G., Nicholas, J.J., Dennick, L.G.,
Fellerman, H.,:
The diagnosis of hypercortisolism. Biochemical
criteria differentiating patients from lean
and obese normal subjects and from females on
oral contraceptives.
J. clin. Endocr. 29:1191, 1969
- 96 Sweat, M.L.:
Sulfuric acid-induced fluorescence of
corticosteroids.
Analyt. Chem. 26:773, 1954
- 97 Teller, W.:
Der C₁₉ und C₂₁-Steroidstoffwechsel während
der Pubertät.
Internist, 8:298, 1967

- 98 Thijssen, J.H.H., Van den Berg, J.H.M.,
Adlercreutz, H., Gijzen, A.H.J., de Jong, F.H.,
Meijer, J.C., Moolenaar, A.J.:
The determination of cortisol in human plasma:
evaluation and comparison of seven assays.
Clin. chim. Acta, 100:39, 1980
- 99 Turner, W.J., Cohn, S.:
Total body potassium and 24 hour creatinine
excretion in healthy males.
Clin. Pharmacol. Ther. 18:405, 1975.
- 100 Urbanic, R.C., George, J.M.:
Cushing's disease - 18 years experience.
Medicine, 60:14, 1981
- 101 Vestergaard, P.:
Factors affecting the excretion of common
neutral steroids in urine.
Acta Endocr. Suppl. 217:11, 1978
- 102 Wachstumsstudie Zürich nach Prader. Nicht
veröffentlicht.
- 103 Walker, M.S.:
Urinary free 11-hydroxycorticosteroid/crea-
tinine ratios in early morning urine samples as
an index of adrenal function.
Ann. Clin. Biochem. 14:203, 1977
- 104 Weiss, L., Löffler, G., Petrides, P. E. :
Hormone. In: Harper, H.A., Löffler, G.,
Petrides, P.E., Weiss, L. (Eds):
Physiologische Chemie. Eine Einführung in die
medizinische Biochemie für Studierende der
Medizin und Ärzte.
Berlin, Heidelberg, New York, 627 ff., 1975

- 105 Yallow, R.S., Berson, S.A.:
Assay of plasma insulin in human subjects by
immunological methods.
Nature 184:1648, 1959
- 106 Zimmermann, W.:
Eine Farbreaktion der Sexualhormone und ihre
Anwendung zur quantitativen colorimetrischen
Bestimmung.
Z. physiol. Chem. 233:257, 1935
- 107 Zorab, P.A.:
Normal creatinine and hydroxyproline excretion
in young persons.
Lancet 29:1164, 1969
- 108 Zumoff, B., Bradlow H.L., Gallagher, T.F.,
Hellman, L.:
Cortisol metabolism in cirrhosis.
J. Clin. Invest. 46:1735, 1967

Lebenslauf

Geboren 9.12.1957 in Kaufbeuren, r.k.

Eltern Engelbert Schmölz, Bauer i. R.
Anna Schmölz, geborene Högg

Schulen Grundschule 1964-1968
St. Marien-Gymnasium Kaufbeuren,
1968-1977,
Abitur Juni 1977

Studium Studium der Humanmedizin in München
1978-1984

Approbation Dezember 1984

Berufstätigkeit Seit März 1985 wissenschaftliche
Assistentin am Pathologischen
Institut der Universität

